Aus der Chirurgischen Klinik und Poliklinik
der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. L. Koslowski

Nachweis gerinnungsaktiver Proteine in Serumkonserven und deren klinische Relevanz

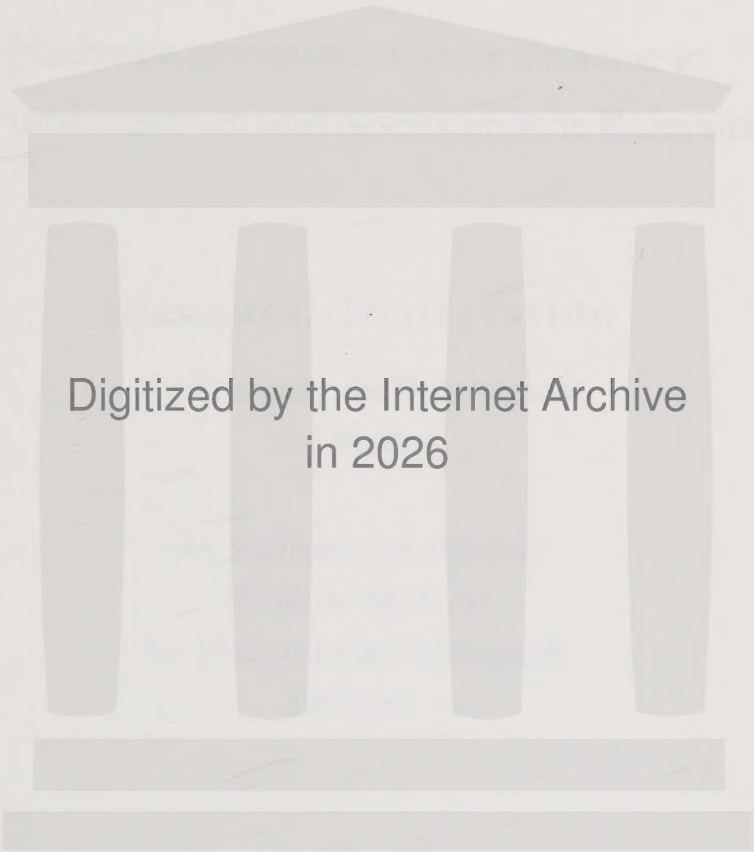
Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
(Klinische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
Tübingen

vorgelegt von
WALDEMAR STÜRMER
aus Ansbach/Mfr.

1986


Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543903_0093

Aus der Chirurgischen Klinik und Poliklinik
der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. L. Koslowski

Nachweis gerinnungsaktiver Proteine in Serumkonserven und deren klinische Relevanz

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
(Klinische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
Tübingen

vorgelegt von
WALDEMAR STÜRMER
aus Ansbach/Mfr.

1986

Dekan: Professor Dr. W. Schulte
1. Berichterstatter: Professor Dr. W. Heller
2. Berichterstatter: Professor Dr. R. Schorer

Druck: Zeeb-Druck, Tübingen 7 (Hagelloch)

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
A.	EINLEITUNG	1
B.	ALLGEMEINER TEIL	4
	1. Das Kallikrein-Kinin-System	4
	2. Plasminogen-Plasmin	7
	3. Das inhibitorische System	8
	3.1. Antithrombin III	9
	3.2. Antiplasmin	11
	3.3. α_2-Makroglobulin	12
	3.4. α_1-Antitrypsin	14
C.	MATERIAL und METHODEN	15
	1. Probanden und klinische Methoden	15
	2. Materialien	17
	3. Untersuchungsmethoden	18
	3.1. Prekallikrein	18
	3.2. Kallikrein	21
	3.3. Plasminogen	22
	3.4. Antithrombin III	25
	3.5. Antiplasmin	27
	3.6. α_2-Makroglobulin	29
	3.7. α_1-Antitrypsin	31

Seite

D. ERGEBNISSE 33

1. Humanserumkonserve Seretin^{R} 33
2. Prekallikrein 34
3. Kallikrein 36
4. Plasminogen 39
5. Antithrombin III 41
6. Antiplasmin 43
7. α_2-Makroglobulin 45
8. α_1-Antitrypsin 47

E. DISKUSSION 49

1. Prekallikrein und Kallikrein 49
2. Plasminogen 51
3. Das inhibitorische System 52

F. ZUSAMMENFASSUNG 55

G. LITERATURVERZEICHNIS 57

H. TABELLEN-ANHANG 71

A. EINLEITUNG

Zur Substitution von Blutverlusten steht dem Kliniker heute eine Anzahl von verschiedenen sogenannten Plasmaersatzmitteln zur Verfügung. Es wird unterschieden zwischen heterologen (Kristalloide, Kolloide) und homologen Plasmaersatzmitteln (Fresh-Frozen Plasma = FFP, i.v.-Immunglobulinen, Serumkonserven).

Gerade Letztere erfahren in jüngster Zeit eine Erweiterung der Indikationsbereiche. I.v.-Immunglobulin-Präparate und Humanserumkonserven werden zum reinen Volumenersatz bzw. Substitution von Antikörpern bei Agammaglobulinämien und primären Antikörpermangelsyndromen empfohlen (83, 115, 121, 152). Auch als Therapie und zur Prophylaxe von sekundären Antikörpermangelsyndromen bei Multiplem Myelom, M. Waldenström, lymphatische Leukämien, nach aggressiver Chemotherapie, Sepsis und beim Postaggressionssyndrom werden diese Präparate häufig verwendet (11, 13, 38, 76, 85).

Immunglobuline werden durch verschiedene Verfahren aus dem Serum isoliert, wobei meist Neutralsalze oder Alkohol zur Ausfällung verwendet werden, zum Teil auch polymere Kunststoffe wie Polyäthylenglykol (PEG). Ausgangsmaterial ist immer ein Pool von mindestens 1000 gesunden, freiwilligen Spendern. Die Präparate kommen meist in Form von 5%-igen Immunglobulin- oder Proteinlösungen in den Handel.

Eine Veränderung der Proteinmolekülstruktur durch das Aufarbeitungsverfahren und die Sterilisierung lassen eine Änderung der biologischen Aktivität erwarten. Möglicherweise sind solche Veränderungen für bestimmte Nebenwirkungen verantwortlich (59, 155, 168).

Die Immunglobuline G weisen je nach Herstellungsverfahren verschiedene Molekülgrößen auf: Neben ungespaltenen IgG-

Molekülen (7-S-Antikörper) finden sich Fab (3,5-S-Antikörper) und Fc-Fragmente bei der Plasmin- und Papain-Präparation, $F(ab)_2$ (5-S-Antikörper) und pFc-Fragmente bei der Pepsin-Herstellung (158, 167). S bezeichnet dabei das molekülgrößenabhängige Sedimentationsverhalten in der Ultrazentrifuge.

In den Humanserumkonserven sind neben Immunglobulinen der Klasse G auch IgM (19-S-Antikörper) und IgA, Transportproteine, Inhibitoren und Enzyme enthalten. Die unterschiedliche Zusammensetzung der Präparate ermöglicht eine differenzierte Indikationsstellung und ist für verschiedene unerwünschte Reaktionen beim Empfänger bedeutsam.

Die Nebenwirkungen lassen sich auf bestimmte Grundmechanismen zurückführen: Auswirkungen der einzelnen Bestandteile der Präparate (z.B. Antigene, Fc-Fragmente), Sensibilisierung oder Aktivierung von pharmakologischen Folgereaktionen. Vom Prinzip her werden zwei Reaktionsformen unterschieden: Die phlogistische oder Immunkomplex-Reaktion und die anaphylaktoide oder pseudoallergische Reaktion.

Die phlogistische Reaktion tritt vor allem bei Personen mit Antigen-Überschuß nach Infusion von 7-S-Präparaten (Gamma-Venin^R, Intraglobin^R, Sandoglobin^R, Endoglobin^R u.a.) mit intaktem Fc-Teil auf. Pathophysiologisch kommt es zur Exozytose von Enzymen aus Granulozyten durch den Antigen-Antikörper-Komplex, vermittelt durch die Fc-Teil-bedingte Komplementaktivierung und die bei künstlichem Antikörper-Überschuß erhöhte Löslichkeit der Komplexe mit nachfolgender verlangsamter Elimination (64, 78, 155). Typisch für diese Reaktionsform ist das verzögerte Auftreten 1 bis 4 Stunden nach der Infusion. Klinische Symptome sind: Exacerbation von Entzündungsreaktionen, wie Verstärkung von Erythemata, Arthritiden und Infiltraten, Anstieg der Körpertemperatur um 0,5 bis 2^o C, Frösteln und Schütteln, Leukozytose mit Linksverschiebung, Anstieg der Akute-Phase-Proteine. Die Häufigkeit der phlogistischen Reaktion liegt je nach

Infusionsgeschwindigkeit und Proteingehalt der Präparate zwischen 8 und 13 % (59).

Die Freisetzung von Entzündungsmediatoren und die spontane Komplementaktivierung mit Bildung der Anaphylatoxinen C3a und C5a sind für die anaphylaktische Reaktion verantwortliche Mechanismen. Ein Auftreten ist grundsätzlich bei jedem Individuum möglich. Patienten mit primären Antikörpermangelsyndromen, hier vor allem der spezifische IgA-Mangel durch IgA-Antikörper, sind besonders prädisponiert für diese Reaktionsform (84, 48, 137, 15o).

Klinisch typisch ist ein rascher Eintritt nach Behandlungsbeginn (1 bis 20 Min.) mit leichteren Symptomen, wie Hauterscheinungen (Flush) oder schwere Reaktionsformen mit Schockcharakter. Die Häufigkeit anaphylaktischer Reaktionen nach Infusion von kolloidalen Plasmaersatzmitteln wird mit 0,01 bis 1 % angegeben (59).

Akute Blutdruckabfälle nach Gabe von Plasmaproteinpräparaten werden mit dem Gehalt an vasoaktiven Enzymen des Kontaktaktivierungssystem in Zusammenhang gebracht (9, 1o, 6o, 94). Vor allem die erhöhte Aktivität von PKA (Prekallikreinaktivator, Faktor-XII-Fragment) und Kallikrein in Präparaten, die mit Polyäthylenglykol (PEG) behandelt wurden, zeigen eine deutliche Korrelation mit der Höhe der Nebenwirkungsrate (153, 57, 58).

Neuere Untersuchungen (1o, 141, 183) über die Zusammensetzung von Immunglobulinpräparaten weisen erneut auf deren Gehalt an Prekallikrein-Aktivator bzw. Kallikrein hin. WOLLMANN hat die Zusammensetzung zweier verschiedener Serumkonserven auf deren Konzentrationen und Aktivitäten einiger Serumproteine hin analysiert. Auffallend war die geringe Konzentration an Immunglobulinen (ca. 50 % der Normalplasmawerte), die Anwesenheit von IgA und die fehlende Aktivität des Inhibitors Antithrombin III in den untersuchten Präparaten. Der Nachweis

der Komplementfaktoren C3a und C3c legt nahe, daß das Komplementsystem während des Herstellungsverfahrens aktiviert wurde. Besonders auffallend war die hohe Kallikrein-Aktivität bzw. "Kallikrein-like-activity".

Betrachtet man die zentrale Stellung des Kallikrein-Kinin-Systems innerhalb der Blutdruckregulation, der Gerinnung, der Fibrinolyse und des Komplementsystems (siehe allg. Teil), so stellt sich die Frage, inwieweit bei einer Infusion dieser Konserven klinische Reaktionen oder andere laborchemisch zu erfassende Veränderungen im Organismus auftreten. Zur Klärung dieser Frage wurde eine Untersuchung mit der auffälligen Humanserumkonserve Seretin^{R} durchgeführt.

Um Veränderungen im Kallikrein-Kinin-System nachzuweisen, wurden Prekallikrein und Kallikrein (Kallikrein-like-activity) bestimmt. Einflüsse auf das Gerinnungssystem, die Fibrinolyse und das inhibitorische System wurden über die Parameter: Plasminogen, Antiplasmin, Antithrombin III, α_2-Makroglobulin und α_1-Antitrypsin erfaßt.

Die Bestimmung der Werte erfolgte unmittelbar vor der Infusion, 10 Minuten und 2 Stunden nach der Infusion der Serumkonserve im venösen Plasma. Die nativen Konserven wurden ebenfalls auf dieselben Parameter untersucht.

B. ALLGEMEINER TEIL

1. Das Kallikrein-Kinin-System

Kinine sind niedermolekulare Oligopeptide aus der Gruppe der "Gewebshormone", die verschiedene Wirkungen, Wie die Erhöhung der Gefäßwandpermeabilität, Kontraktion glatter Muskelzellen, Erweiterung von kleinen Blutgefäßen und Schmerzauslösung vermitteln. Die Kinine werden aus ihren inaktiven Vorstufen, den Kininogenen, durch Einwirkung des Enzyms Kallikrein freigesetzt.

Kallikrein wurde zuerst aus menschlichem Urin und Pankreasextrakten isoliert, wobei seine blutdrucksenkende Wirkung entdeckt wurde (43, 91).

Eine Unterscheidung in Organkallikreine und Plasmakallikreine ergab sich auf Grund ihrer spezifischen Eigenschaften gegenüber ihren Substraten, Inhibitoren und Aktivatoren. Organkallikreine setzen aus low molecular weight (LMW) Kininogenen das Kallidin, Plasmakallikrein aus high molecular weight (HMW) Kininogenen das Bradykinin frei (65).

Die Aktivierung von Plasmakallikrein aus seiner inaktiven Form, dem Prekallikrein, erfolgt durch die Wirkung des Hageman Faktors (F XII) oder dessen Spaltprodukte (F XII f) (87, 94, 176). Organkallikreine werden durch Trypsin aus ihren inaktiven Vorstufen freigesetzt. Für die Inaktivierung der Kinine sorgen die Kininase I und II, wobei die Kininase II identisch mit dem Angiotensin I converting enzyme (ACE I) ist (41). Kallikrein wird in vitro gehemmt durch verschiedene Proteine aus dem inhibitorischen System wie Antithrombin III (23, 173), $C\bar{1}$-Inhibitor (5o, 136), α_2-Makroglobulin (66) und α_2-Antiplasmin (144).

Die blutdrucksenkende Wirkung der Kallikreine wird über die Bildung von Bradykinin erklärt (65). Die Rolle des Kallikreins und der Kinine bei der Schmerzauslösung und der Entzündungsreaktion beruht auf der Freisetzung von Prostaglandin E und F durch Kinine (65) und der Verbindung des Kallikreins zum Immunsystem, wobei die Aktivierung des Komplementsystems durch die Freisetzung der C_1-Esterase aus ihrer inaktiven Vorstufe erreicht wird (35).

Ein Einfluß der Kinine auf die Regulation des Blutdrucks erscheint möglich durch die Beziehung des Kallikrein-Kinin-Systems zum Renin-Angiotensin-System und dem adrenergen System, wobei hier ein gewisser Antagonismus zwischen blutdrucksenkender und blutdruckerhöhender Wirkung besteht (65, 111, 171, 174).

Die Rolle des Plasmakallikreins in den Blutgerinnungsprozessen beruht auf der Einbeziehung in das Intrinsic-System während

der Kontaktphase. Es besteht eine Verbindung zwischen der Aktivierung von Prekallikrein durch F XII a und umgekehrt, wobei sich dieser Prozeß, einmal gestartet, selbst unterhält und so den F XI zu F XI a aktiviert (28, 86, 87). Damit werden die Gerinnungsabläufe weiter initiiert. Gleichzeitig besteht über den Hageman Faktor und der Aktivierung des Plasminogens zu Plasmin eine Beziehung zum fibrinolytischen System (28, 31, 89, 90).

Eine Veränderung der Plasmaprekallikrein- und Kallikreinspiegel wurde beschrieben bei Patienten mit septischem Schock, akuter Pankreatitis, dissiminierter intravasaler Gerinnung (DIC) und bei Leberzirrhose (1, 51, 149, 175). Patienten mit kongenitalem Mangel an Prekallikrein zeigen eine stark verlängerte partielle Thromboplastinzeit (184, 185).

Durch Messung von Prekallikrein und Kallikrein ist es möglich, diffuse Gerinnungsstörungen wie das DIC-Syndrom oder thromboembolische Tendenzen frühzeitig zu verifizieren (182).

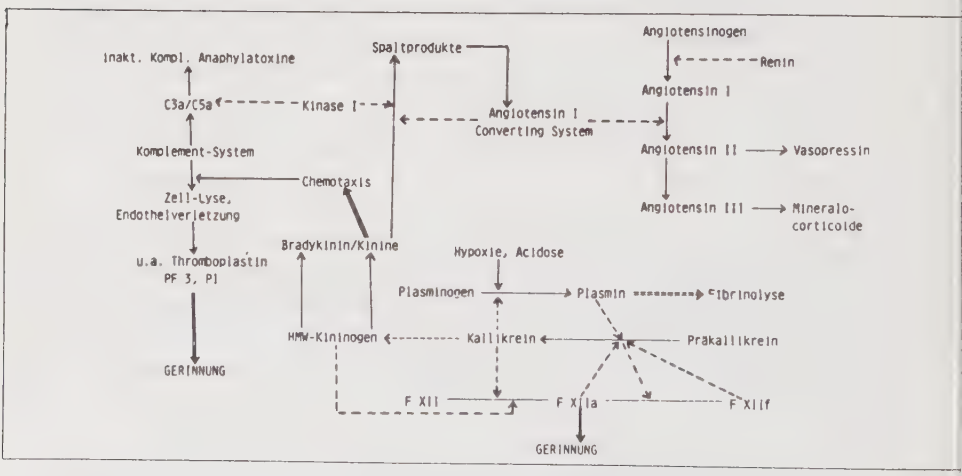


Abb. 1: Der Effekt von Kallikrein und seiner Aktivierungsprodukte (183).

2. Plasminogen - Plasmin

Die Fibrinolyse, die Auflösung von Blutgerinnseln, spielt in der Hämostase eine ebenso wichtige Rolle wie die zur Blutgerinnung führenden Prozesse.

Die Auflösung eines Fibringerinnsels erfolgt zum überwiegenden Teil durch ein proteolytisches Enzym, dem Plasmin (6). Auch andere Proteasen wie Leukozyten-Enzyme können unter bestimmten Umständen zur Fibrinspaltung fähig sein (63, 131). Außer Fibrin vermag Plasmin in vitro auch Fibrinogen (110), Faktor V (5), Faktor VIII (37, 128) zu spalten und Komponenten des Komplementsystems zu aktivieren (129).

Plasmin liegt im Blut hauptsächlich in Form einer inaktiven Vorstufe, dem Plasminogen, vor. Plasminogen ist ein Plasmaglykoprotein mit einem Molekulargewicht von 90.000. Die Konzentration im Plasma beträgt ca. 200 bis 400 ug/ml (78, 134). In geringerer Konzentration läßt sich Plasminogen in anderen Körperflüssigkeiten nachweisen. Plasminogen wird, wie viele andere Blutgerinnungssubstanzen, in der Leber synthetisiert (145).

Die Umwandlung von Plasminogen zu Plasmin durch proteolytische Spaltung erfolgt auf Grund der Wirkung spezifischer Plasminogenaktivatoren. Ähnlich dem "intrinsic" und "extrinsic" System der Thrombinaktivierung erfolgt die Aktivierung der Fibrinolyse durch "intrinsic" und "extrinsic" Plasminogenaktivatoren. Erstere werden freigesetzt, wenn Blut in Kontakt mit gefäßfremden Oberflächenstrukturen kommt. Es sind dies der Hageman-Faktor (F XII), Prekallikrein und Faktor XI (28, 88, 89, 122). Für die Aktivierung von Plasminogen bedeutender sind aber die "extrinsic" Plasminogenaktivatoren, die in fast allen Gewebsarten, vor allem aber im Gefäßendothel vorhanden sind (102, 105, 123). Andere bekannte Aktivatoren sind die mit dem Urin ausgeschiedene Urokinase und die von ß-hämolysierenden Streptokokken produzierte Streptokinase (104). Beide Substanzen sind physiologischerweise nicht im Blut vorhanden, werden aber

in der Therapie zur Lyse von frischen thrombotischen Gefäßverschlüssen eingesetzt.

Geringe Mengen von Plasmin im Blut führen noch nicht zur Spaltung des Fibrins, da im Plasma unter normalen Umständen ein Überschuß an Plasmininhibitoren für eine schnelle Inaktivierung sorgt. Hauptinhibitor ist das α_2-Antiplasmin (172). Andere Inhibitoren wie α_2-Makroglobulin (49, 54), Antithrombin III (75, 159), C$\bar{1}$-INH (166) und α_1-Antitrypsin (49, 56, 71) spielen in der Regulation der Fibrinolyse eine untergeordnete Rolle. Erst ein Überschuß an Plasmin vermag die Fibrinolyse in Gang zu bringen. Durch die Proteolyse von Fibrin und Fibrinogenen entstehen Fibrin- und Fibrinogenspaltprodukte, die ihrerseits die einmal in Gang gekommene Fibrinolyse durch eine Hemmung des Thrombins und der Plättchenaggregation aufrecht erhalten (110).

Eine Aktivierung des Komplementsystems durch Plasmin wurde (in vitro) von verschiedenen Autoren beschrieben. Die tatsächliche Bedeutung dieser Interaktion erscheint aber in vivo weiterhin unklar (20, 98, 101, 135).

3. Das inhibitorische System

Menschliches Plasma enthält eine Vielzahl von Proteinen, die in der Lage sind, die Aktivität der an Blutgerinnung und Fibrinolyse beteiligten Faktoren und Enzyme zu hemmen (72, 114, 119, 124, 139). Die wichtigsten, gut charakterisierten Inhibitoren, wie Antithrombin III, α_2-Makroglobulin, α_1-Antitrypsin, α_2-Antiplasmin, C$\bar{1}$-Inaktivator und Protein C sind in Tabelle 1 dargestellt.

Inhibitoren	normale Plasma-Konzentration (mg/dl)	hereditäre Mangelzustände
Antithrombin III	18-30	Thrombose
α_2-Makroglobulin	150-350	?
α_1-Antitrypsin	200-400	Lungenemphysem
Antiplasmin	5-7	Blutungsneigung
C$\bar{1}$-Inhibitor	15-35	hereditäres angio-neurotisches Ödem
Protein C	0,4	Thrombose

Tab. 1: Natürlich vorkommende Plasma-Inhibitoren (146).

Interessant erscheint, daß die Plasmakonzentration dieser Inhibitoren wesentlich höher ist als die der Gerinnungsfaktoren. Sie stellen etwa 20 % der Globulinfraktion des menschlichen Plasmas dar. Das Spektrum der Wirkung dieser Substanzen ist breit und überlappt sich teilweise. Die Inhibitoren hemmen und lokalisieren die Gerinnung und die Fibrinolyse, sind involviert in entzündliche Reaktionen und tragen letzlich dazu bei, das Blut in einer flüssigen Phase zu stabilisieren.

3.1. Antithrombin III (AT III)

Der bei weitem wichtigste Plasmainhibitor ist das Antithrombin III (74, 142, 151, 156). AT III ist ein α_2-Globulin mit einem Molekulargewicht von 65.000. Seine Konzentration in normalem Plasma beträgt etwa 30 ug/ml (2, 72).

AT III inhibiert vor allem das Thrombin, mit dem es einen irreversiblen 1:1-Komplex bildet (4, 142). Bei dieser Reaktion verlieren beide Proteine ihre Aktivität. Der zeitliche Ablauf

der Reaktion ist relativ langsam und wird als Progressiv-Inhibition beschrieben. Durch Heparin, einem Mucopolysaccharid aus Mastzellen, wird die Komplexbildung zu einer wesentlich schneller ablaufenden Sofortreaktion. Heparin verbindet sich mit AT III (Heparin-Cofaktor) und induziert eine Konformationsänderung des AT-III-Moleküls, wodurch die reaktive Seite des Proteins für Thrombin leichter zugänglich gemacht wird (3, 15, 33, 103). Diese Wirkung des Heparins wird therapeutisch bei der Antithromboseprophylaxe angewandt. Da der AT-III-Heparin-Komplex jedoch rascher aus dem Blut eliminiert wird als freies AT III, kommt es nach längerer Behandlung mit Heparin zu einem Abfall des AT-III-Spiegels und damit zu einem Nachlassen der Heparinwirkung (33, 1o9).

Neben der Thrombinhemmung hat AT III eine inhibitorische Wirkung auf andere aktivierte Faktoren der Blutgerinnungskaskade. Besondere Beachtung verdient dabei der Effekt auf den Faktor Xa. Ähnlich der Inaktivierung von Thrombin durch AT III wird der Faktor Xa durch die Anwesenheit von Heparin wesentlich schneller inhibiert als dies ohne Heparin möglich ist. Die Heparin-Cofaktor-Funktion des AT III auf F Xa scheint ausgeprägter zu sein als die auf Thrombin (14, 62, 157, 186). Die Faktoren IXa, XIa und XIIa sind andere Angriffspunkte der inhibitorischen Wirkung des AT III auf die Blutgerinnung (33, 69).

Über eine Desaktivierung von Plasmakallikrein wirkt AT III indirekt durch eine verminderte Freisetzung von Plasminogen und direkt durch Hemmung von Plasmin auf fibrinolytische Prozesse (23, 173).

Die physiologische Bedeutung des AT III läßt sich am besten anhand der wiederholt auftretenden thromboembolischen Ereignisse bei Patienten mit kongenitalem AT-III-Mangel zeigen (108). Klinisch manifest wird bereits ein Abfall um 20 bis 50 % des Normalwertes (100, 143).

Ein Verbrauch von AT III wird durch jede Aktivierung des Gerinnungssystems induziert. Bei starken Blutverlusten, bei der disseminierten intravasalen Gerinnung (DIC) des Schockgeschehens und beim Leberzerfallskoma kann der Verbrauch an AT III die Resynthese durch die Leber übersteigen und so zu einem gefährlichen Abfall des AT-III-Spiegels führen (21, 34).

Verminderte AT-III-Werte sind bei Venenthrombose, Sepsis, nach chirurgischen Eingriffen, bei Antikonzeptiva-Einnahme, während der postprandialen Lipämie sowie im Alter beschrieben worden (36, 42, 73, 164).

Die Messung der AT-III-Aktivität stellt somit einen wichtigen Parameter zur frühzeitigen Erkennung von Störungen im Gerinnungssystem dar.

3.2. Antiplasmin

Antiplasmin (α_2-Antiplasmin, α_2-Plasmin-Inhibitor) ist der wichtigste, schnell reagierende Inhibitor des Plasmins. Bevor es entdeckt wurde, galten lange Zeit α_2-Makroglobulin und α_1-Antitrypsin als die wirksamsten Plasmainhibitoren der Fibrinolyse (29, 116, 118).

Antiplasmin ist ein einkettiges Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von etwa 70.000 (116, 179) und hemmt die fibrinolytische Aktivität des freien Plasmins durch Bildung eines 1:1-Komplexes (25, 26, 180). Einmal an Fibrinogen angelagertes Plasmin wird dagegen nur noch schwach durch Antiplasmin inhibiert. Der Grund hierfür liegt in der identischen Bindungsstelle des Plasmins für Fibrinogen und α_2-Antiplasmin (181).

Ein anderer Hemm-Mechanismus besteht in der direkten Inhibition des Plasminogens durch Antiplasmin (120) und in der Konkurrenz zwischen Antiplasmin und Plasminogen um die Bindung an das Fibrinmolekül (7).

Während der Blutgerinnung sollen etwa 20 % des Antiplasmins an Fibrin gebunden sein, wodurch die Lyse der Fibringerinnsel durch Plasmin verhindert wird. Dieser Vorgang wird durch den aktivierten Faktor XII katalysiert (147, 148). Wahrscheinlich spielt dieser Vorgang auch in der Hemmung der physiologischen Fibrinolyse eine wesentliche Rolle.

Neben der Inhibition von Plasmin vermag Antiplasmin noch eine Reihe von Proteasen des Blutgerinnungs- und des Kallikrein-Kinin-Systems zu hemmen. Beschrieben wurde eine Hemmwirkung auf Faktor-XII-Fragmente (Prekallikreinaktivator), Plasma-Kallikrein, Faktor XIa, Faktor Xa und Thrombin (117, 144).

Die normale Antiplasminkonzentration im Plasma beträgt etwa 5 bis 7 ug/ml (8, 116, 118, 179). Die Plasmahalbwertszeit liegt beim Gesunden und bei Patienten mit Atherosklerose zwischen 2,5 und 3 Tagen (3o). Synthetisiert wird Antiplasmin durch Zellen des Leberparenchyms (8, 79, 145).

Neutrale Leukozyten-Proteasen, wie das Kathepsin G und die Elastase vermögen Antiplasmin und andere Inhibitoren der Blutgerinnung und der Fibrinolyse durch proteolytische Spaltung zu inaktivieren (8o, 81, 92). Die Freisetzung dieser Leukozytenenzyme kann auf Grund einer lokal nicht mehr suffizienten Inhibitorkonzentration zu einem Verbrauch an Plasmafaktoren führen. Klinisches Beispiel ist der septische Schock, ausgelöst durch Endotoxine gramnegativer Bakterien, der auf dem Weg des beschriebenen Mechanismus zu einer disseminierten intravasalen Gerinnung (DIC) führen kann (47, 81).

3.3. α_2-Makroglobulin

α_2-Makroglobulin, ein aus mehreren Untereinheiten aufgebautes Makro-Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 725.000, besitzt unter den derzeit bekannten Plasmaproteininhibitoren das breiteste Hemmspektrum. Inhibiert werden unspezifische

Proteinasen (Trypsin, Chymotrypsin), die Elastase der polymorphzelligen Neutrophilen und die Kathepsine G, B und D. In Blutgerinnung und Fibrinolyse involvierte Plasmafaktoren, wie Thrombin, Plasmakallikrein und Plasmin sind andere bekannte Angriffspunkte (12, 68, 98).

Die Inhibitorwirkung auf das Thrombin ist allerdings im Vergleich zu der des Antithrombin III wesentlich geringer (165). Plasmin-Inhibition erfolgt erst nach der "schnellen" Inhibition durch das Antiplasmin, wenn bei aktivierter Fibrinolyse Plasmin im Überschuß vorliegt, in einer langsam ablaufenden Reaktion mit α_2-Makroglobulin (29, 118).

α_2-Makroglobulin bindet Proteasen wie Plasmin und Thrombin stöchiometrisch an eine seiner Untereinheiten, wobei eine Konformationsänderung des α_2-Makroglobulin-Moleküls eintritt. Das aktive Zentrum der Protease bleibt intakt und kann noch mit niedermolekularen Substraten reagieren. Die Reaktion mit höhermolekularen Substraten ist dagegen aus sterischen Gründen stark limitiert. Letzteren ist eine Annäherung an das im Komplex gebundene Enzym räumlich unmöglich (67, 162).

Im Inhibitor-System des Plasmas nimmt α_2-Makroglobulin außerdem die Aufgabe eines Transportproteins wahr, indem es von anderen Enzym-Inhibitor-Komplexen, z.B. aus dem α_1-Antitrypsin-Komplex, Enzyme entgegennimmt und eliminiert. α_2-Makroglobulin-Komplexe werden bei einer Halbwertszeit von 10 bis 12 Minuten schnell aus der Zirkulation durch Zellen des mononuklearen phagozytierenden Systems (RES) entfernt (125, 126, 127).

Die Konzentrationen von α_2-Makroglobulin im Plasma oder Serum gesunder Personen werden unterschiedlich angegeben. Der Normalbereich erstreckt sich über Werte zwischen 150 und 450 mg%, wobei eine deutliche Abhängigkeit von Alter und Geschlecht auffällt. Kinder im Alter von 1 bis 3 Jahren haben bis um das Doppelte höhere Werte als Erwachsene mit 25 Jahren, Frauen etwa 10 bis 20 % höhere Werte als Männer (54, 132, 177).

Erhöhte α_2-Makroglobulin-Werte wurden beschrieben bei Patienten mit Leberzirrhose und mit nephrotischem Syndrom, erniedrigte Werte bei einer Sepsis und bei der Therapie mit Streptokinase. Werte bis 20 bis 40 % der Normalkonzentration bleiben jedoch klinisch asymptomatisch (112).

3.4. α_1-Antitrypsin

α_1-Antitrypsin (α_1-Proteinasen-Inhibitor) ist ein einkettiges Glykoprotein aus der α_1-Globulinfraktion des Plasmas mit einem Molekulargewicht von 55.000 (24).

α_1-Antitrypsin vermag Trypsin und eine Anzahl anderer Proteasen einschließlich Chymotrypsin, Plasmin und Elastase in einer langsam verlaufenden, irreversiblen 1:1-Komplexbildung zu inhibieren (22, 32, 161).

Das Protein wird im menschlichen Serum in verschiedenen Typen gefunden und wird durch eine Serie autosomal-codominanter Allele vererbt. Hereditärer α_1-Antitrypsinmangel führt gehäuft zum Lungenemphysem und zur Leberzirrhose, jedoch nicht zu einem vermehrten Auftreten von Thrombosen.

Die normale Plasmakonzentration liegt beim Erwachsenen in einem Bereich zwischen 200 und 400 mg%. Die Halbwertszeit beträgt etwa 6 Tage (93).

Die Frage, inwieweit α_1-Antitrypsin an der Hemmung des Thrombins beteiligt ist, wird von verschiedenen Autoren unterschiedlich beantwortet. Bei normaler Plasmakonzentration ist der Anteil an der Gesamt-Antithrombin-Aktivität des Plasmas, wenn überhaupt, dann nur von geringer Bedeutung (99, 107).

Unter den Plasmainhibitoren des aktivierten Faktors XI stellt α_1-Antitrypsin die Hauptthemmkapazität (70). Zusätzlich wird der Faktor Xa in die Hemmung mit einbezogen (154). Eine Hemmung des Kallikreins wird in älteren Arbeiten beschrieben,

konnte aber in neueren Arbeiten nicht mehr nachgewiesen werden (50, 113).

C. MATERIAL UND METHODEN

1. Probanden und klinische Methoden

Es wurde ein einfacher Blindversuch mit einer Probandengruppe (Seretin^{R}-Gruppe) und einer Kontrollgruppe (NaCl-Gruppe) durchgeführt.

Das Gesamtkollektiv setzte sich aus 22 Patienten der Kieferchirurgischen Klinik Tübingen zusammen. Es wurden nur freiwillige Versuchspersonen ausgewählt, die zuvor gründlich internistisch durchuntersucht waren und während des Versuchszeitraumes nicht an akuten oder chronischen Erkrankungen litten. Das mittlere Alter der Probandengruppe lag bei 32,5 Jahren, das mittlere Gewicht bei 71,9 kg und die mittlere Größe bei 174,8 cm. Die entsprechenden Werte der Kontrollgruppe betrugen für das Alter 28,4 Jahre, für das Gewicht 62,5 kg und für die Körpergröße 169,4 cm.

Die Probandengruppe (Tab. 2) erhielt eine einmalige Infusion mit 250 ml einer Humanserum-Konserve (Seretin^{R}). Die Infusionsdauer betrug 30 Minuten. Die erste und zweite Versuchsperson der Probandengruppe erhielten eine Konserve der Chargen-Nr. 446440, die restlichen Versuchspersonen (Nr. 3 bis 14) der Chargen-Nr. 446448.

Pat.	Nr.	Alter (J)	Größe (cm)	Gewicht (kg)
S.P. ♂	01	23	188	83
F.W. ♂	02	35	195	100
K.L. ♀	03	45	165	57
C.W. ♂	04	21	171	72
S.E. ♂	05	54	170	78
W.A. ♂	06	53	178	72
H.G. ♂	07	23	187	69
G.U. ♂	08	20	170	69
L.T. ♂	09	18	181	71
H.R. ♂	10	20	173	66
G.R. ♂	11	26	172	81
B.R. ♀	12	47	169	63
J.S. ♀	13	30	158	55
H.H. ♂	14	40	170	80

Tab. 2: Daten der in die Probandengruppe einbezogenen Patienten

Pat.	Nr.	Alter (J)	Größe (cm)	Gewicht (kg)
B.R. ♀	01	46	168	60
P.J. ♀	02	39	154	63
G.B. ♀	03	23	174	65
A.B. ♀	04	18	168	58
W.R. ♀	05	33	168	60
B.B. ♂	06	20	165	57
Z.D. ♀	07	25	161	51
S.M. ♂	08	23	287	86

Tab. 3: Daten der in die Kontrollgruppe einbezogenen Patienten

Die Kontrollgruppe (Tab. 3) bekam eine Infusion mit 250 ml

0,9%-iger NaCl-Lösung unter den gleichen Bedingungen wie die Probandengruppe.

Die Blutabnahme erfolgte venös zu drei unterschiedlichen Zeitpunkten: Kurz vor der Infusion, 10 Minuten und 120 Minuten nach Ende der Infusion.
Für die Plasmagewinnung werden 9 Teile des frisch entnommenen Blutes mit einem Teil 3,13%-igem Natriumcitrat in unbeschichteten Kunststoffröhrchen gemischt und anschließend bei 3000 u/min für 20 Minuten zentrifugiert. Der Plasmaüberstand wird mit einem sterilen Pyrogenfilter der Fa. GELMAN, Ann. Arbor, USA, filtriert, in Aliquots zu 2 ml geteilt in Plastikröhrchen gegeben und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Probenaufbewahrung bis zur Analyse erfolgte bei -20° C im Eisschrank.

2. Materialien

Die Humanserum-Konserve Seretin^{R} (BEHRINGWERKE AG, Frankfurt) wurde in Infusionsflaschen mit 250 ml Inhalt der Chargen-Nr. 446440 bzw. 446448 verwendet. In 5%-iger Plasmaprotein-Konzentration sind lt. Hersteller in physiologischem Elektrolytmilieu enthalten: Albumin, IgG, IgA, IgM, Haptoglobulin, Hämopexin, Transferrin, Coeruloplasmin, α_2-Makroglobulin und Cholinesterase (160).

Prekallikrein, Kallikrein, Plasminogen, Antithrombin III, Antiplasmin, α_2-Makroglobulin und α_1-Antitrypsin wurden mittels chromogener Substrate bestimmt. H-D-Pro-Phe-Arg-pNA x HCl (S-2302) der DEUTSCHE KABI GmbH, München, BRD, wurde zur Bestimmung der Prekallikrein- und Kallikrein-Aktivität im Plasma eingesetzt. H-D-Val-Leu-Lys-pNA x 2HCl (S-2251), ein chromogenes Substrat der oben genannten Firma, wurde für die Bestimmung von Plasmin und Antiplasmin-Konzentration im Plasma verwendet. Mit dem Substrat Tos-Gly-Pro-Arg-pNA x AcOH (Chromozym^{R}TH) der BOEHRINGER MANNHEIM GmbH, Mannheim, BRD, wurde die Antithrombin-III-Aktivität im Plasma gemessen. Die Substrate

Z-Val-Gly-Arg-pNA (Chromozym^{R} TRY) und Benzoyl-D,L-arginin-p-nitroanilid (BAPA) der BOEHRINGER MANNHEIM GmbH, Mannheim, BRD, wurden zur Messung der Inhibitorischen Aktivität von α_2-Makroglobulin bzw. α_1-Antitrypsin im Plasma verwendet.

Prekallikrein wurde mit dem Plasma-Prekallikrein-Aktivator der DEUTSCHEN KABI GmbH, München, BRD, zu Kallikrein aktiviert. Zur Aktivierung von Plasminogen diente Streptokinase (Kabinase^{R}) des gleichen Herstellers.

Die photometrischen Bestimmungen wurden mit einem Photometer Typ PL 4 von ZEISS, Oberkochen, BRD, durchgeführt. Es wurden Einmalküvetten der Fa. GREINER, Nürtingen, BRD, verwendet.

Die statistische Auswertung erfolgte mittels einer einfachen Multivariat Varianzanalyse am Recheninstitut der Universität Tübingen.

3. Untersuchungsmethoden

3.1. Prekallikrein (45, 52, 97, 17o)

Testprinzip:
Durch einen Kontaktaktivator (Plasma-Prekallikrein-Aktivator) wird der Faktor XII (F XII) aktiviert. Kallikrein wird daraufhin durch den aktivierten Faktor XII (F XIIa) und high molecular weight Kininogen (HMW-Kininogen) aus Prekallikrein freigesetzt. Um eine ausreichende Aktivierung von Prekallikrein zu erreichen, sind Faktor XII und HMW-Kininogen notwendig. Der benutzte Aktivator enthält diese beiden Proteine in ausreichender Konzentration. Das gebildete Kallikrein katalysiert die Abspaltung von para-Nitroanilin (p-NA) aus dem chromogenen Substrat H-D-Pro-Phe-Arg-pNA. Nach Abstoppen der Reaktion

mit Essigsäure wird die Menge freigesetzten pNA nach einer bestimmten Zeit im Photometer gemessen (Endpunktmethode) und mit der erhaltenen Extinktion die Konzentration an Prekallikrein im Plasma im Vergleich zu einem Normalkollektiv bestimmt (Abb. 2).

Abb. 2: Testprinzip der Prekallikreinbestimmung mittels eines chromogenen Substrats

Reagenzien:

a) Substrat:
25 mg Substrat S-2302 (H-D-Pro-Phe-Arg-pNA x2HCl) werden in 20 ml destilliertem Wasser gelöst. Unter sterilen Bedingungen hergestellte Lösung ist bei 2 bis 8° Celsius circa sechs Monate haltbar.

b) Aktivator:
Der lyophilisierte Plasma-Prekallikrein-Aktivator des Test-Kits wird mit 5 ml destilliertem Wasser gelöst. Die so erhaltene Aktivatorlösung ist bei 2 bis 8° Celsius etwa 24 Stunden, bei -20° Celsius etwa einen Monat stabil.

c) Puffer-Lösung:
6,1 g Tris wird in 800 ml destilliertem Wasser gelöst und mit 1 mol/l HCl auf pH 7,8 eingestellt. Die Lösung wird mit destilliertem Wasser auf 1000 ml aufgefüllt. Der Puffer ist bei 2 bis 8° Celsius aufbewahrt mindestens sechs Monate haltbar.

d) 50%-ige Essigsäure

Probenbereitung:

50 µl Patientenplasma werden mit 3000 µl Tris-Puffer pH 7,8 verdünnt. Da Prekallikrein kälteaktivierbar ist (27), sollten die Plasmaproben bei 15 bis 25° Celsius aufbewahrt werden. Das Auftauen der bei -20° Celsius schockgefrorenen Plasmaproben erfolgt in einem speziellen Wasserbad.

Eichkurve:

Um eine Eichkurve (25% bis 100% der Norm) für Prekallikrein zu erhalten, wird das gepoolte Citratplasma von zehn gerinnungsgesunden Spendern nach Schema Tab. 4 mit Tris-Puffer pH 7,8 verdünnt.

Prekallikrein %	Normales Plasma µl	Puffer µl
25	100	300
50	200	200
75	300	100
100	400	-

Tab. 4: Verdünnungsreihe zur Erstellung einer Prekallikrein-Eichkurve

Testdurchführung:

200 µl Plasma-Prekallikrein-Aktivator werden 3 bis 4 Minuten im Wasserbad bei 37° Celsius erwärmt. 200 µl Plasmaverdünnung werden hinzugegeben, gemischt und für weitere 2 Minuten bei 37° Celsius inkubiert. Danach werden 200 ul Substratlösung hinzupipettiert und sofort gemischt. Nach exakt 2 Minuten Inkubation bei 37° Celsius wird die Reaktion mit 200 µl Essigsäure 50% gestoppt. Für jede Plasmaprobe wird ein Probenleerwert benötigt. Dieser wird durch Zufügen der gleichen Reagenzien in umgekehrter Reihenfolge ohne Inkubation erstellt. Es

wird anschließend die Extinktionsdifferenz zwischen Probe und Leerwert bei 405 nm im Photometer bestimmt. Die Auswertung erfolgt gegen die Eichkurve.

3.2. Kallikrein (Kallikrein-"like Activity") (52, 96)

Testprinzip:
Die Plasma-Kallikrein-Aktivität katalysiert die Abspaltung von para-Nitroanilin aus dem chromogenen Substrat S-2302 (H-D-Pro-Phe-Arg-pNAxHCl). Die Menge des abgespaltenen pNA wird nach Abstoppen der Reaktion mit 50%-iger Essigsäure bei 405 nm im Photometer bestimmt. Die gemessene Aktivität stammt wahrscheinlich aus einem Komplex des Enzyms mit α_2-Makroglobulin.

$$\text{H-D-Pro-Phe-Arg-pNA x HCl} \xrightarrow{\text{Kallikrein}} \text{H-D-Pro-Phe-Arg-OH} + \text{pNA}$$
$$+ \ H_2O$$

Abb. 3: Testprinzip der Kallikreinbestimmung mittels chromogenen Substrats

Reagenzien:
a) Substrat:
25 mg chromogenes Substrat S-2302 werden in 20 ml destilliertem Wasser gelöst. Unter sterilen Bedingungen hergestellt, ist diese 2 mmol/l Lösung bei 2 bis 8^0 Celsius circa sechs Monate haltbar.

b) Puffer-Lösung:
6,1 g Tris und 6,6 g NaCl werden in 800 ml destilliertem Wasser gelöst und mit 1 mol/l HCl bei 25^0 Celsius auf einen pH von 7,8 eingestellt. Die Lösung wird mit destilliertem Wasser auf 1000 ml aufgefüllt. Sie ist bei 2 bis 8^0 Celsius aufbewahrt mindestens sechs Monate haltbar.

c) 50%-ige Essigsäure

Probenbereitung:

100 µl Patientenplasma werden mit 1000 µl Tris-Puffer pH 7,8 verdünnt. Diese Probenverdünnung wird zur Kallikrein-Bestimmung eingesetzt. Um eine Kälteaktivierung von Prekallikrein zu vermeiden, sollte das Plasma bei 15 bis 25° Celsius für nicht länger als einige Stunden aufbewahrt werden oder sofort auf -20° Celsius eingefroren werden. Nach dem Auftauen sollte das Plasma bei einer Temperatur von 15 bis 25° Celsius gehalten und bald aufgearbeitet werden. Die Kallikrein-Aktivität in dem eingefrorenen Plasma kann durch den Einfrier- und Auftauprozeß etwas erhöht werden (52).

Testdurchführung:

200 µl der verdünnten Plasmaprobe werden im Wasserbad bei 37° Celsius 3 bis 4 Minuten lang erwärmt. Danach werden 200 ul einer auf 37° Celsius vorerwärmten S-2302-Lösung dazugegeben und gemischt. Nach genau 10 Minuten Inkubation wird die Reaktion durch Zugabe von 200 µl 50%-iger Essigsäure abgestoppt. Für jede Plasmaprobe wird ein Probenleerwert benötigt. Dieser wird durch Zugabe der gleichen Reagenzien in umgekehrter Reihenfolge ohne Inkubation erstellt. Es wird die Extinktionsdifferenz zwischen Probe und Leerwert bei 405 nm im Photometer bestimmt. Die Kallikrein-Aktivität in U/l wird durch Multiplikation des erhaltenen Extinktionswertes mit dem Faktor 344 errechnet.

3.3. Plasminogen (44, 46, 130, 163).

Testprinzip:

Streptokinase im Überschuß bildet mit dem im Plasma enthaltenen Plasminogen einen enzymatisch aktiven Komplex. Dieser Plasminogen-Streptokinase-Komplex (P-S-K) ist in der Lage, die Abspaltung von para-Nitroanilin aus dem chromogenen Substrat S-2251 (H-D-Val-Leu-Lys-pNAx?HCl) zu katalysieren. Da Streptokinase im Überschuß eingesetzt wird, ist die vorliegende

Plasminogenmenge vollständig gebunden und kann nicht mehr zu Plasmin aktiviert oder durch Plasmin-Inaktivatoren inhibiert werden. Die in einer bestimmten Zeiteinheit freigesetzte Menge pNA verhält sich proportional zu der vorliegenden Menge Plasminogen. Die pNA-Freisetzung wird bei 405 nm im Photometer gemessen und gegen eine Eichkurve die Plasminogen-Konzentration ermittelt.

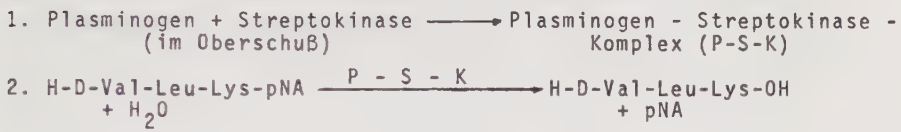


Abb. 4: Testprinzip der Plasminogenbestimmung mittels chromogenen Substrats

Reagenzien:

a) Substrat:

25 mg Substrat S-2251 werden in 15 ml destilliertem Wasser gelöst. Unter sterilen Bedingungen hergestellt, ist die Lösung bei 2 bis 8° Celsius etwas sechs Monate verwendbar.

b) Aktivator:

Streptokinase (Kabinase®) wird mit destilliertem Wasser auf eine Konzentration von 10.000 IU/ml verdünnt.

c) Puffer-Lösung:

6,1 g Tris und 0,7 g NaCl werden in 800 ml destilliertem Wasser gelöst und mit 1 mol/l HCl bei 25° Celsius auf pH 7,4 eingestellt. Die Lösung wird mit destilliertem Wasser auf 1000 ml aufgefüllt. Sie ist bei 2 bis 8° Celsius mindestens sechs Monate haltbar.

d) Substrat-Puffer-Lösung:
Zwei Teile Substrat-Lösung werden mit fünf Teilen Puffer-Lösung gemischt. Die erhaltene Lösung ist bei 20 bis 25° Celsius maximal drei Tage haltbar.

c) 50%-ige Essigsäure
Eichkurve:
Ein EDTA-Plasma-Pool von zehn gerinnungsgesunden Spendern wird nach Tab. 5 verdünnt. Die erhaltenen Verdünnungen werden wie die Plasmaproben behandelt. Es resultiert eine Eichkurve zwischen 25 bis 100 % der Norm.

Plasminogen %	Normales Plasma µl	Puffer µl
25	25	75
50	50	50
75	75	25
100	100	-

Tab. 5: Verdünnungsreihe zur Erstellung einer Plasminogen-Eichkurve

Testdurchführung:
50 µl der zu untersuchenden Patienten-Plasmen werden mit 2 ml Puffer-Lösung verdünnt. 200 µl dieser Probe werden bei 37° Celsius im Wasserbad zwei bis sechs Minuten lang erwärmt. Danach werden 100 µl Streptokinase-Lösung (10.000 IU/ml) zugesetzt und weitere zehn Minuten bei 37° Celsius erwärmt. Jetzt werden 700 µl der Substrat-Puffer-Lösung hinzupipettiert und sofort gemischt. Nach 3-minütiger Inkubation wird die Reaktion durch Zugabe von 100 µl 50%-iger Essigsäure abgestoppt. Die Extinktion wird bei 405 nm im Photometer gegen

einen Probenleerwert ermittelt. Der Leerwert besteht aus 200 µl Plasmaverdünnung, 100 µl 50%-iger Essigsäure und 800 µl destilliertem Wasser. Die Auswertung erfolgt mittels der erstellten Eichkurve.

3.4. Antithrombin III (16, 73, 140)

Testprinzip:

Antithrombin III (AT III) bildet mit Heparin einen 1:1-Komplex (AT III-Heparin), der die proteolytische Wirkung von Thrombin sofort hemmt. Das Patientenserum wird mit einem Oberschuß von Heparin und Thrombin versetzt. Das nicht von Antithrombin gehemmte Thrombin setzt aus dem chromogenen Substrat Tos-Gly-Pro-Arg-pNA (Chromozym® TH) para-Nitroanilin frei, dessen Extinktion bei 405 nm im Photometer gemessen wird.

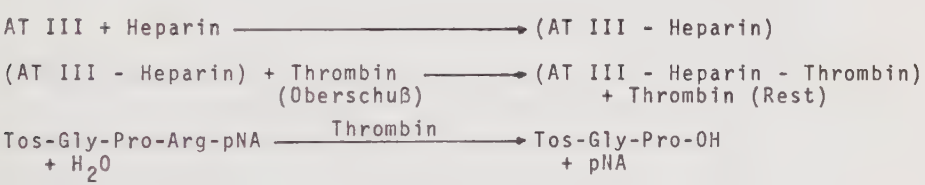


Abb. 5: Testprinzip der Antithrombin-III-Bestimmung mittels chromogenen Substrats Chromozym® TH

Reagenzien:

a) Substrat:

Das lyophilisierte Substrat, das dem Test-Kit entnommen wird, wird in 4 ml destilliertem Wasser gelöst. Es resultiert eine Lösung mit der Konzentration 150 mmol/l. Die Substratlösung kann, bei 4° Celsius aufbewahrt, bis zu einem Monat verwendet werden.

b) Thrombin:
Das dem Test-Kit entnommene lyophilisierte Thrombin wird in 3 ml destilliertem Wasser gelöst. Man erhält eine Thrombin-Lösung des Gehalts: 0,5 UI/ml. Die Lösung ist bei 4° Celsius ungefähr zwei Wochen verwendbar.

c) Puffer-Lösung:
Das dem Test-Kit entnommene Puffer-Konzentrat enthält:

Tris/HCl	100 mmol/l; pH 8,1
Heparin	1,75 USP-Einheiten/ml
Aprotinin	6,5 IU/ml
NaCl	150 mmol/l

Das Puffer-Konzentrat wird mit destilliertem Wasser 1:10 verdünnt. Die Haltbarkeit des erhaltenen Puffers beträgt bei 4° Celsius ungefähr einen Monat.

d) 2o%-ige Essigsäure
Testdurchführung:
Die Thrombin-Lösung wird im Verhältnis 1 + 20 mit der Puffer-Lösung vermischt und vor Gebrauch circa 30 Minuten bei 15 bis 25° Celsius stehen gelassen. In einem Kunststoffgefäß beträgt die Haltbarkeit dieser Lösung bei 15 bis 25° Celsius etwa acht Stunden, bei 4° Celsius zwei Tage. 2 ml der auf diese Weise hergestellten Reagenzmischung werden mit 100 µl Patientenserum versetzt und bei 25° Celsius im Wasserbad für fünf Minuten inkubiert. Danach werden 200 µl der Substratlösung hinzupipettiert, sofort gemischt und die Reaktion nach exakt zwei Minuten durch Zugabe von 1 ml 20%-iger Essigsäure abgestoppt. Die Extinktion wird im Photometer bei 405 nm gegen einen Leerwert, bestehend aus 200 µl Substratlösung, 1 ml 20%-iger Essigsäure und 100 µl einer 0,9%-igen NaCl-Lösung, gemessen. Die Extinktionsdifferenz, mit dem Faktor 97 multipliziert, ergibt die AT-III-Aktivität in IU/ml. (Normalwerte bei 25° Celsius Reaktionstemperatur: 10-15 IU/ml). Richtigkeit und Präzision werden mit dem Humancitrat-Plasma Precichrom I/II^{R} (19) überprüft.

3.5. Antiplasmin (4o, 95, 172)

Testprinzip:

Antiplasmin bildet mit Plasmin einen Komplex, der die katalytische Aktivität von Plasmin hemmt. Das Patientenserum wird mit einem Überschuß von Plasmin versetzt. Das nicht von Antiplasmin gebundene Plasmin spaltet aus dem chromogenen Substrat S-2251 para-Nitroanilin (pNA) ab. Die Farbentwicklung wird photometrisch bei 405 nm gemessen, nach Abstoppen der Reaktion mit Essigsäure (Endpunktmethode). Das Testsystem ist so ausgelegt, daß die Extinktion im Bereich 25 bis 125% Antiplasmin linear ist. Die unbekannte Antiplasmin-Konzentration ermittelt man mit der Standardkurve, erstellt aus bekannten Normal-Plasma-Konzentrationen.

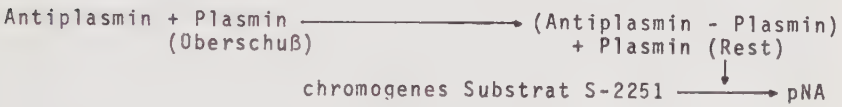


Abb. 6: Testprinzip der Antiplasmin-Bestimmung mittels chromogenen Substrats

Reagenzien:

a) Substrat:

19 mg lyophilisiertes Substrat S-2251 aus dem Test-Kit werden mit 10 ml destilliertem Wasser gelöst. Die Substrat-Konzentration beträgt 3,5 mmol/l. Bei 2 bis 8° Celsius aufbewahrt, kann die Lösung sechs Monate verwendet werden.

b) Plasmin-Solvent:

Das Test-Kit enthält 10 ml gebrauchsfertiges Lösungsmittel für Plasmin, bestehend aus Glyzerin und 2 mmol/l HCl im Verhältnis 1 + 1. Die Lösung ist bis zum aufgedruckten Verfallsdatum haltbar.

c) Plasmin:
22 nkat lyophilisiertes humanes Plasmin aus dem Test-Kit wird in 10 ml Plasmin-Solvent aufgelöst. Man erhält eine Lösung mit der Plasmin-Konzentration von 2 nkat S-2251/ml. Die Haltbarkeit beträgt bei 2 bis 8° Celsius etwa einen Monat. Die Lösung wird vor Gebrauch mindestens eine Stunde bei 25° Celsius erwärmt.

d) Puffer:
Es wird ein dem Test-Kit entnommener steriler Tris-Puffer 0,05 mol/ pH 7,4 verwendet. Er ist bis zum aufgedruckten Verfallsdatum haltbar.

e) 50%-ige Essigsäure
Standardkurve:
500 µl humanes Normalserum wird mit 1900 µl Puffer verdünnt und eine Verdünnungsreihe nach Tab. 6 für die Standardkurve (0 bis 125%) angesetzt.

Puffer µl	verd. Normal-Plasma µl	Antiplasmin-Konzentr. % v. Normal-Plasma
2500	0	0
2400	100	25
2300	200	50
2200	300	75
2100	400	100
2000	500	125

Tab. 6: Standardkurve für die Antiplasmin-Bestimmung

Testdurchführung:
Durch Lösen von 100 ml Patientenserum in 3 ml Puffer wird eine Probenvorbereitung hergestellt. 200 µl der verdünnten Plasmaprobe werden bei 37° Celsius im Wasserbad über drei bis sechs

Minuten inkubiert. Dann werden 200 µl Plasmin (Raumtemperatur) hinzupipettiert, gemischt und bei 37° Celsius inkubiert. Nach genau 20 Sekunden Inkubation werden 200 µl S-2251-Lösung (37°C) hinzugegeben, gemischt und über weitere zwei Minuten erwärmt. Die Reaktion wird nach dieser Zeit mit der Zugabe von 100 µl 50%-iger Essigsäure abgestoppt. Die Extinktion wird im Photometer bei 405 nm gegen einen Leerwert, bestehend aus 600 µl Probenverdünnung, 100 µl 50%-iger Essigsäure und 400 µl destilliertem Wasser gemessen. Die Antiplasmin-Konzentration der Plasmaprobe wird an der erstellten Standardkurve abgelesen.

3.6. α_2-Makroglobulin (17, 53)

Testprinzip:
Trypsin bildet mit α_2-Makroglobulin einen Komplex. Im ersten Schritt wird Trypsin im Überschuß zur Plasmaprobe gegeben, so daß ungebundenes hemmaktives α_2-Makroglobulin gebunden wird. Das überschüssige Trypsin (Trypsin-Rest) wird dann im weiteren Schritt durch Zugabe von Aprotinin vollständig inaktiviert. Der Aprotinin-Trypsin-Komplex ist enzymatisch inaktiv. Danach kann die Aktivität des α_2-Makroglobulin-Trypsin-Komplex mittels Abspaltung von para-Nitroanilin aus dem chromogenen Substrat Z-Val-Gly-Arg-pNA (Chromozym^{R}TRY) bestimmt werden. Das entstandene pNA wird bei 405 nm im Photometer gemessen. Als Normalwerte werden für Citratplasma Werte zwischen 130 und 310 mg/100 ml angegeben.

α_2-Makroglobulin + Trypsin (Überschuß) $\longrightarrow$ α_2-Makroglobulin - Trypsin + Trypsin (Rest)

Trypsin (Rest) + Aprotinin $\longrightarrow$ Aprotinin - Trypsin - Komplex

Z-Val-Gly-Arg-pNA $\xrightarrow{\alpha_2\text{-Makroglobulin-Trypsin}}$ Z-Val-Gly-Arg-OH + pNA

Abb. 7: Testprinzip der α_2-Makroglobulinbestimmung mittels chromogenen Substrats

Reagenzien:

a) Puffer:

Der gebrauchsfertige Puffer des Test-Kits enthält:

Tris/HCl	100 mmol/l; pH 8,0
NaCl	150 mmol/l

Der Puffer ist bei 2 bis 8° Celsius bis zum aufgedruckten Verfallsdatum verwendbar.

b) Trypsin:

Lyophilisiertes Trypsin aus dem Test-Kit wird mit 2 ml destilliertem Wasser gelöst. Die erhaltene Lösung enthält Trypsin in der Konzentration von 10 U/ml. Die Haltbarkeit beträgt bei 4 bis 8° Celsius vier Wochen, bei 15 bis 25° Celsius zwei Tage.

c) Aprotinin:

Lyophilisiertes Aprotinin aus dem Test-Kit wird mit 4 ml destilliertem Wasser gelöst. Die erhaltene Lösung enthält 25 IU/ml Aprotinin. Die Haltbarkeit beträgt bei 4 bis 8° Celsius vier Wochen, bei 15 bis 25° Celsius zwei Tage.

d) Substrat:

Das chromogene Substrat (Chromozym^{R} TRY) des Test-Kits wird in 3 ml destilliertem Wasser gelöst. Der Substratgehalt der entstandenen Lösung beträgt 5 mmol/l. Die Lösung ist bei 2 bis 8° Celsius drei Tage, bei 15 bis 25° Celsius 24 Stunden haltbar.

Testdurchführung:

Es wird ein Reaktionsgemisch aus der Trypsinverdünnung und dem Puffer im Verhältnis 10 + 0,25 hergestellt. Zu 2 ml dieses Reaktionsgemisches werden 0,05 ml einer 1 : 20 mit 0,9%-igen NaCl-Lösung verdünnten Plasmaprobe hinzupipettiert, gemischt und eine Minute bei 25° Celsius im Wasserbad inkubiert. Danach werden 0,1 ml der Aprotinin-Lösung hinzugegeben, gemischt und weitere zwei Minuten bei 25° Celsius inkubiert. Abschließend werden 0,2 ml der Substrat-Lösung hinzupipettiert, gemischt und eine Minute bei Meßtemperatur inkubiert. Danach wird die

Extinktion bei 405 nm im Photometer abgelesen. Weitere Extinktionsmessungen erfolgen minütlich bis fünf Minuten nach der Substrat-Zugabe. Die Aktivitätsberechnung in IU/ml erfolgt durch Multiplikation der Extinktionsdifferenz pro Minute mit dem Faktor 101,5.

3.7. α_1-Antitrypsin (18, 77)

Testprinzip:
Trypsin bildet mit α_1-Antitrypsin (α_1AT) einen stabilen Komplex (α_1-AT-Trypsin-Komplex). Wird Trypsin im Oberschuß zu der Plasmaprobe gegeben, wird der inhibitorische Anteil des α_1-Antitrypsins inaktiviert. Das überschüssige Trypsin spaltet im weiteren Schritt das Substrat Benzoyl-D,L-arginin-p-nitroanilid (BAPA) in Benzoylarginin und para-Nitroanilin. Die Farbentwicklung durch das freigesetzte para-Nitroanilin wird bei 405 nm im Photometer gemessen und die α_1-Antitrypsin-Aktivität berechnet. Als Richtwerte werden für Citrat-Plasma 1,4 bis 2,1 IU/ml bzw. 190 bis 300 mg/100 ml angegeben.

α_1-AT + Trypsin (Oberschuß) $\longrightarrow$ Trypsin (Rest) + α_1-AT-Trypsin-Komplex

BAPA $\xrightarrow{\text{Trypsin}}$ Benzoylarginin + p-Nitroanilin

Abb. 8: Testprinzip der α_1-Antitrypsin-Bestimmung mittels chromogenen Substrats

Reagenzien:
a) Puffer:
Der gebrauchsfertige Puffer des Test-Kits enthält:

Tris/HCl	100 mmol/l; pH 8,0
NaCl	150 mmol/l

Der Puffer ist bei 2 bis 8° Celsius bis zum aufgedruckten Verfallsdatum haltbar.

b) Substrat:
Das Substrat Benzoyl-D,L-arginin-p-nitroanilid des Test-Kits wird mit 5 ml destilliertem Wasser gelöst. Der Substratgehalt der Lösung beträgt 20 mmol/l. Sie ist bei Raumtemperatur bis zum aufgedruckten Haltbarkeitsdatum verwendbar.

c) Trypsin:
Lyophilisiertes Trypsin aus dem Test-Kit wird mit 2,5 ml destilliertem Wasser gelöst. Die erhaltene Verdünnung enthält Trypsin in der Konzentration von 0,9 U/ml und ist bei 2 bis 8° Celsius etwa zwei Wochen haltbar.

Testdurchführung:
Es wird ein Reaktionsgemisch aus der Trypsin-Lösung und dem Puffer im Verhältnis 1 + 20 hergestellt. Die Haltbarkeit dieser Lösung beträgt bei Raumtemperatur sechs Stunden. Zu 2 ml dieses Reaktionsgemisches werden 0,05 ml einer mit 0,9%-iger NaCl-Lösung im Verhältnis 1 : 10 verdünnten Plasmaprobe hinzupipettiert, gemischt und fünf Minuten bei 25° Celsius im Wasserbad inkubiert. Danach werden 0,2 ml der Substrat-Lösung hinzugegeben, sofort gemischt und nach 60 Sekunden die Extinktion bei 405 nm im Photometer abgelesen. Nach weiteren 30, 60 und 90 sec wird die Extinktionsmessung wiederholt. Aus den Extinktionsdifferenzen pro 30 sec wird der Mittelwert gebildet. Für jede Meßreihe ist mindestens ein Trypsinleerwert erforderlich. Dieser besteht aus 0,1 ml 0,9%-iger NaCl-Lösung anstelle von Plasmaverdünnung, 2 ml Reagenzgemisch und 0,2 ml Substrat-Lösung. Die Berechnung der α_1-Antitrypsin-Aktivität im IU/ml erfolgt über Multiplikation der Extinktionsdifferenzen pro 30 sec aus Probe und Leerwert mit dem Faktor 52,1. Richtigkeit und Präzision werden mit dem Human-Citrat-Plasma Precichrom^R I/II (19) überprüft.

D ERGEBNISSE

1) Humanserumkonserve Seretin^R: Gehalt an Plasmaproteinen aus dem Kallikrein-Kinin-, fibrinolytischen und inhibitorischen System

Unverdünnte Proben der Humanserumkonserve Seretin^R (5%) wurden anhand der in Teil C dargestellten Methoden auf die Konzentration bzw. Aktivität folgender Plasmaproteine untersucht: Prekallikrein, Kallikrein, Plasminogen, Antithrombin III, Antiplasmin, α_2-Makroglobulin und α_1-Antitrypsin. Die gefundenen Werte sind in Tabelle 7 dargestellt.

Plasmaproteine	Seretin^R-Chargen-Nr. 446440	446448
Prekallikrein (%)	11,4	4,5
Kallikrein (U/l)	44,6	31,1
Plasminogen (%)	62,2	88,4
Antithrombin III (IU/l)	0,26	2,0
Antiplasmin (%)	59,1	46,8
α_2-Makroglobulin (IU/l)	0,9	1,0
α_1-Antitrypsin (IU/l)	-	-

Tab. 7: Ergebnisse der Konzentrations- bzw. Aktivitätsbestimmung wichtiger Plasmaproteine der Humanserumkonserve Seretin^R

Die Konzentration an Prekallikrein beträgt in den beiden untersuchten Chargen 11,4 bzw. 4,5 % der normalen Humanplasmakonzentration und ist damit in beiden Proben mit über 88 % signifikant erniedrigt.

Die Kallikrein-Aktivität ("Kallikrein-like-activity") liegt bei 44,6 U/l bzw. 33,1 U/l in den untersuchten Proben. Vergleichswerte in normalem Humanplasma (Kabi Diagnostika, Deutsche Kabi GmbH, München) liegen zwischen 68,8 und 103,2 U/l.

Die Plasminogen-Konzentrationen betragen 62,2 bzw. 88,4 % der Norm.

Der Gehalt der Konserve an Proteinen aus dem inhibitorischen System ist zum Teil sehr gering. Gefunden wurden Werte für die Aktivität von Antithrombin III von 0,26 bzw. 2,0 IU/l, für die Konzentration von Antiplasmin 59,1 bzw. 46,8 % der normalen Humanplasma-Konzentration, für die Aktivität von α_2-Makroglobulin von 0,9 bzw. 1,0 IU/l. Eine Aktivität von α_1-Antitrypsin konnte in den beiden untersuchten Konserven nicht nachgewiesen werden.

2) Prekallikrein

Es wurden 14 Probanden je 250 ml der Humanserumkonserve Seretin^R (Seretin^R-Gruppe) und 8 Probanden je 250 ml 0,9%-ige NaCl-Lösung (NaCl-Gruppe) infundiert. Blutproben wurden zum Zeitpunkt kurz vor, 10 Minuten und 120 Minuten nach Infusion abgenommen. Die Konzentration an Prekallikrein wurde mittels dem chromogenen Substrat S-3202 bestimmt. Zur Aktivierung von Prekallikrein wurde ein Plasma-Prekallikrein-Aktivator (Kabi Diagnostika, Deutsche Kabi GmbH, München) verwendet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 8 und Abbildung 9 dargestellt.

	kurz vor Infusion	10 Min. nach Infusion	120 Min. nach Infusion
Seretin^{R}-Gruppe n = 14 $\bar{x} \pm s$ (% d.N.)	124,3 ± 24,0	126,4 ± 25,1	124,1 ± 27,1
NaCl-Gruppe n = 8 $\bar{x} \pm s$ (% d.N.)	121,7 ± 17,5	106,8 ± 12,8	112,5 ± 24,3

Tab. 8: Prekallikrein-Konzentration im Plasma nach Infusion von 250 ml Seretin^{R} (Seretin-Gruppe) und 250 ml 0,9%-iger NaCl-Lösung (NaCl-Gruppe) vor, 10 Min. nach und 120 Min. nach der Infusion

Die Ausgangswerte der Prekallikrein-Konzentration betragen in der Seretin^{R}-Gruppe ca. 124 %, in der NaCl-Gruppe ca. 121 % des Normalwertes. In der Seretin^{R}-Gruppe tritt nach der Infusion keine signifikante Änderung des Prekallikrein-Spiegels ein. In der NaCl-Gruppe ist ein leichter Abfall auf 106,8 % der Norm zum Zeitpunkt 10 Minuten nach Infusion und ein Wiederanstieg auf 112,5 % 120 Minuten nach der Infusion zu verzeichnen.

Zwischen den Gruppen besteht zu den verschiedenen Meßzeitpunkten statistisch kein signifikanter Unterschied ($P > 0,05$).

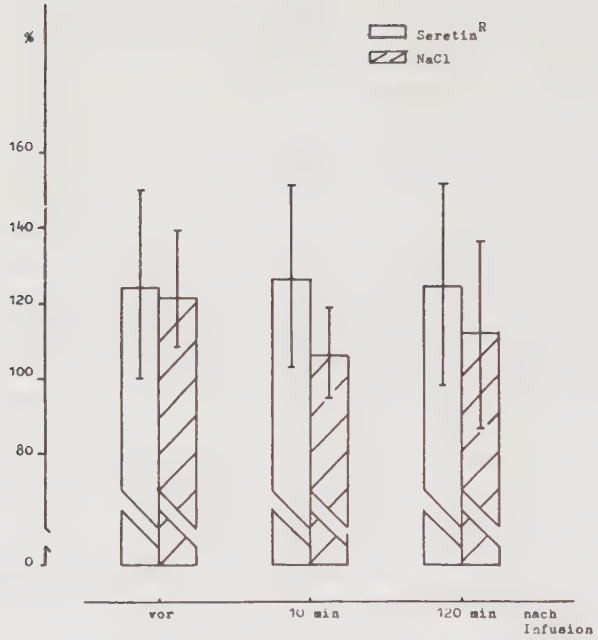


Abb. 9: Prekallikrein-Konzentration im Plasma: Vergleich zwischen Seretin^{R}-Gruppe (n=14) und NaCl-Gruupe (n = 8).

3) Kallikrein

Zwei Probandengruppen, Seretin^{R}-Gruppe (n=14) und NaCl-Gruppe (n=8), wurden jeweils 250 ml Humanserumkonserve Seretin^{R} bzw. 0,9%-ige NaCl-Lösung infundiert. Plasmaproben der Blutabnahmezeitpunkte: kurz vor, 10 Minuten und 120 Minuten nach Infusion gelangten zur Analyse. Die Kallikrein-Aktivität (Kallikrein-"like-activity") wurde mit dem chromogenen Substrat S-2302 bestimmt. Als Vergleichswerte dienten die in normalem Humanplasma (Kabi Diagnostika, Deutsche Kabi GmbH, München)

gefundenen Aktivitäten. Sie liegen in einem Bereich zwischen 70 und 100 U/l. Die Ergebnisse sind in Tabelle 9 und in Abbildung 10 dargestellt.

	kurz vor Infusion	10 Min. nach Infusion	120 Min. nach Infusion
Seretin^{R}-Gruppe n = 14 $\bar{x} \pm s$ (U/l)	116,9 ± 46,5	118.0 ± 47,7	116,1 ± 49,0
NaCl-Gruppe n = 8 $\bar{x} \pm s$ (U/l	116,9 ± 44,2	103,7 ± 42,6	115,7 ± 49,9

Tab. 9: Kallikrein-Aktivität im Plasma vor und nach Infusion von 250 ml Seretin^{R} (Seretin^{R}-Gruppe) und 250 ml 0,9%-iger NaCl-Lösung (NaCl-Gruppe)

Die Ausgangswerte der Kallikrein-Aktivität betragen in der Seretin^{R}-Gruppe und der NaCl-Gruppe 117 U/l mit einer Standardabweichung von ± 46,5 U/l. In der Seretin^{R}-Gruppe bleiben die Aktivitäten zu den verschiedenen Abnahmezeiten konstant. In der NaCl-Gruppe fällt die Aktivität 10 Minuten nach Infusion ca. 13% ab; zum Zeitpunkt 120 Minuten nach Infusion werden Werte gemessen, die identisch mit den Ausgangswerten sind. Die Unterschiede zwischen den Werten der beiden Gruppen zu den einzelnen Zeitpunkten ist statistisch nicht signifikant ($p > 0,05$).

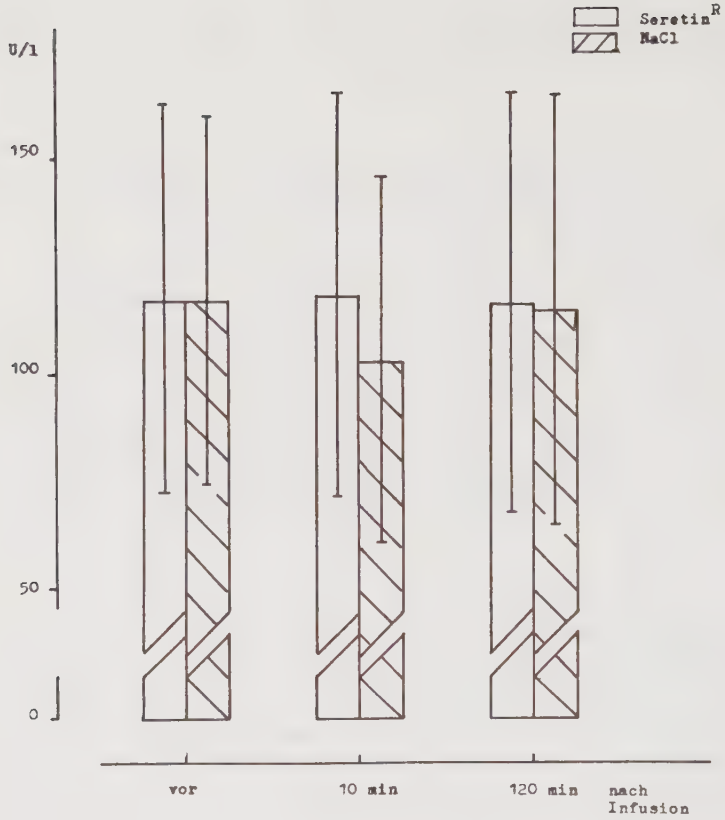


Abb. 10: Kallikrein-Konzentration im Plasma:
Vergleich zwischen Seretin^{R}-Gruppe (n = 14)
und NaCl-Gruppe (n = 8)

4) Plasminogen

Die Plasminogen-Konzentration im Plasma wurde mit dem chromogenen Substrat S-2251 bestimmt. Die Ausgangswerte betragen 119,8 ± 18,6 % in der Seretin^{R}-Gruppe und 113 ± 18,5 % der Norm in der NaCl-Gruppe. Sie sind damit gegenüber der Norm geringfügig aber nicht signifikant erhöht. 10 Minuten nach der Infusion von Seretin^{R} bzw. 0,9%-iger NaCl-Lösung vermindert sich die Konzentration in der NaCl-Gruppe unspezifisch auf 105,1 ± 19,8 %, in der Seretin^{R}-Gruppe bleibt sie praktisch unverändert bis 120 Minuten nach der Infusion. Der 120-Minuten-Wert der NaCl-Gruppe beträgt 103,3 ± 16,5 (Tab. 10). Es gibt keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden untersuchten Gruppen (Abb. 11).

	kurz vor Infusion	10 Min. nach Infusion	120 Min. nach Infusion
Seretin^{R}-Gruppe n = 14 x ± s (% d.N.)	119,8 ± 18,6	117,6 ± 18,0	119,2 ± 14,3
NaCl-Gruppe n = 8 x ± s (% d.N.)	113,1 ± 18,5	105,1 ± 19,8	103,3 ± 16,6

Tab. 10: Plasminogen-Konzentration im Plasma vor und nach Infusion von 250 ml Seretin^{R} (Seretin^{R}-Gruppe) und 250 ml 0,9%-iger NaCl-Lösung (NaCl-Gruppe)

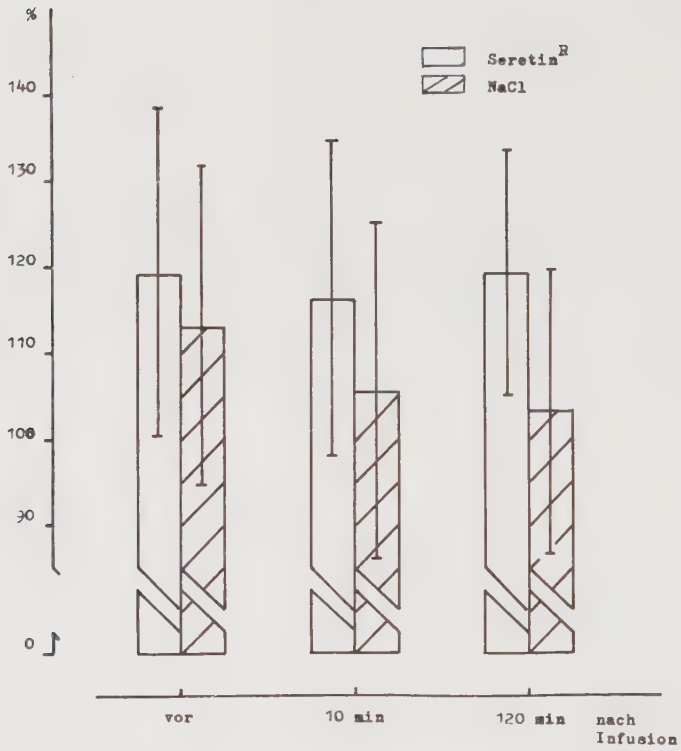


Abb. 11: Plasminogen-Konzentration im Plasma: Vergleich zwischen Seretin®-Gruppe (n = 14) und NaCl-Gruppe (n = 8)

5) Antithrombin III (AT III)

Die Aktivität von AT III in den Plasmen wurde mit Hilfe des chromogenen Substrats Chromozym^{R} TH (siehe Materialien und Methoden) ermittelt.

Die Ausgangswerte vor Infusion liegen für die Seretin^{R}-Gruppe bei 10,1 ∓ 1,5 IU/ml, für die NaCl-Gruppe bei 10,4 ∓ 1,7 IU/ml. Sie liegen somit an der unteren Grenze der für die Bestimmung bei 25^{o} Celsius angegebenen Referenzwerte (10 bis 15 IU/ml).

In der Seretin^{R}-Gruppe tritt nach Infusion der Serumkonserve (250 ml) ein minimaler unspezifischer Anstieg der AT-III-Aktivität um 0,2 IU/ml ein, in der NaCl-Gruppe ein geringer unspezifischer Verlust von ca. 0,5 IU/ml. Die Werte 120 Minuten nach der Infusion sind in beiden Gruppen identisch mit den jeweiligen 10-Minuten-Werten (Tab. 11).

Die Unterschiede zwischen den AT-III-Aktivitäten der beiden untersuchten Gruppen sind zu keinem Meßzeitpunkt signifikant (Abb. 12).

	kurz vor Infusion	10 Min. nach Infusion	120 Min. nach Infusion
Seretin^{R}-Gruppe n = 14 x ∓ s (IU/ml)	10,1 ∓ 1,5	10,3 ∓ 1,6	10,2 ∓ 1,2
NaCl-Gruppe n = 8 x ∓ s (IU/ml)	10,5 ∓ 1,8	10,0 ∓ 1,8	9,8 ∓ 1,2

Tab. 11: Antithrombin-III-Aktivität im Plasma vor und nach Infusion von 250 ml Seretin^{R} (Seretin^{R}-Gruppe) und 250 ml 0,9%-iger NaCl-Lösung (NaCl-Gruppe)

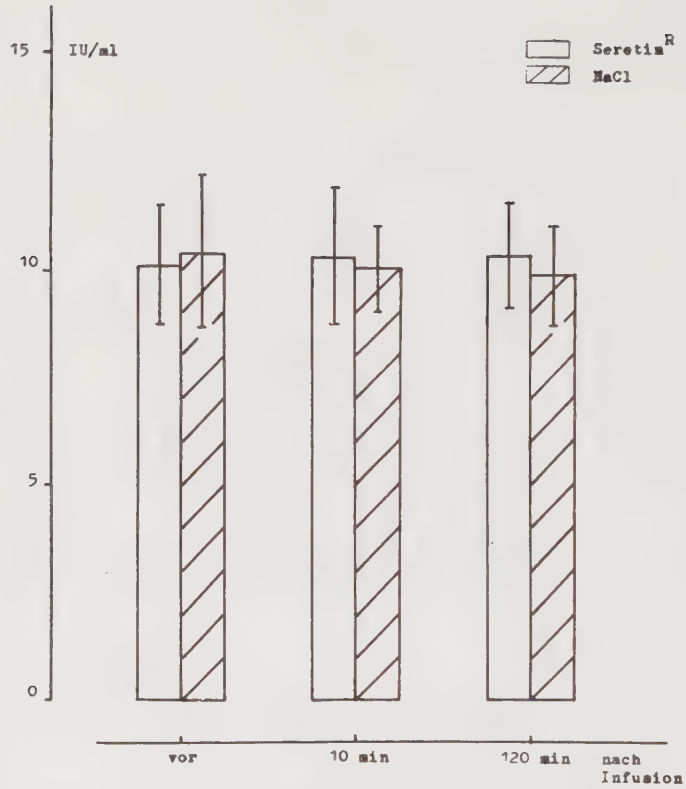


Abb. 12: Antithrombin-III-Aktivität im Plasma: Vergleich zwischen Seretin^{R}-Gruppe (n = 14) und NaCl-Gruppe (n = 8)

6) Antiplasmin

Die Antiplasmin-Konzentration im Plasma wurde mit dem chromogenen Substrat S-2251 bestimmt.

Vor Infusion liegen die Konzentrationen mit 119 ∓ 11,3 % in der Seretin^{R}-Gruppe und mit 118,6 ∓ 24.1 % in der NaCl-Gruppe um fast 20 % über der normalen Plasmakonzentration.

In beiden Gruppen sinkt 10 Minuten nach der jeweiligen Infusion die Antiplasmin-Konzentration geringfügig auf Werte um 116 % der Norm. 120 Minuten nach der Seretin^{R}-Infusion finden sich Werte, die identisch mit den Ausgangswerten sind. In der NaCl-Gruppe vermindert sich der Antiplasmin-Gehalt zu diesem Zeitpunkt unspezifisch um 4 % (Tab. 12).

Die Messungen zu den verschiedenen Zeitpunkten ergaben keinen signifikanten Unterschied zwischen den Antiplasmin-Konzentrationen in der Seretin^{R}-Gruppe und der NaCl-Gruppe (Abb. 13).

	kurz vor Infusion	10 Min. nach Infusion	120 Min. nach Infusion
Seretin^{R}-Gruppe n = 14 x ∓ s (% d.N.)	119,5 ∓ 11,3	116,1 ∓ 20,2	119,7 ∓ 12,8
NaCl-Gruppe n = 8 x ∓ s (% d.N.)	118,6 ∓ 24.1	116,4 ∓ 13,4	112,8 ∓ 13,0

Tab. 12: Antiplasmin-Konzentration im Plasma vor und nach Infusion von 250 ml Seretin^{R} (Seretin^{R}-Gruppe) und 250 ml 0,9%-iger NaCl-Lösung (NaCl-Gruppe)

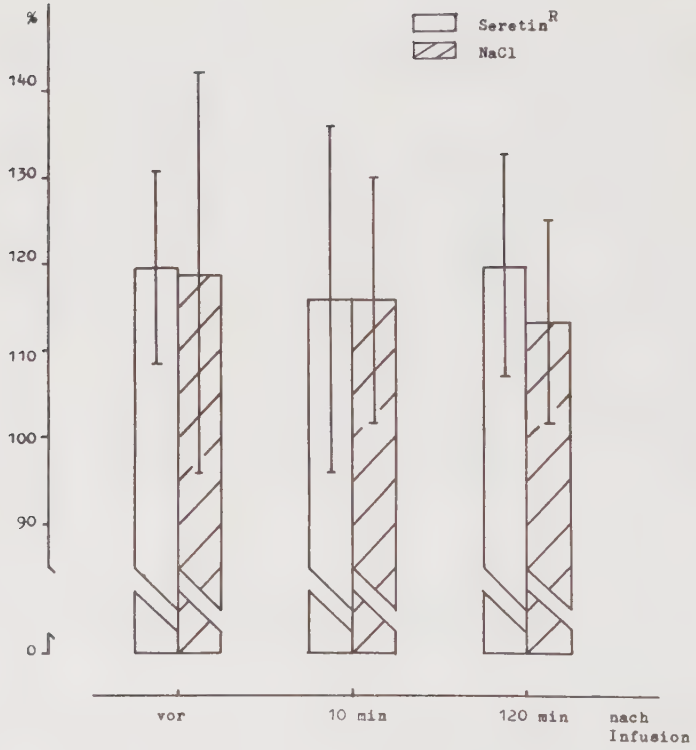


Abb. 13: Antiplasmin-Konzentration im Plasma: Vergleich zwischen Seretin^{R}-Gruppe (n = 14) und NaCl-Gruppe (n = 8)

7) α_2-Makroglobulin

Die inhibitorische Aktivität von α_2-Makroglobulin wurde mit dem chromogenen Substrat Chromozym^{R}TRY gemessen (siehe Material und Methoden).

Als Referenzwerte für den Normalbereich werden für Citratplasma Werte von 4,0 bis 9,4 IU/ml angegeben.

In den Plasmaproben, die vor den Infusionen abgenommen wurden, fanden sich α_2-Makroglobulin-Aktivitäten von 5,3 ∓ 1,9 IU/ml in der Seretin^R-Gruppe und 5,7 ∓ 1,1 IU/ml in der NaCl-Gruppe. Die Ausgangswerte liegen somit im unteren Drittel des Normbereiches.

In der Seretin^R-Gruppe findet keinerlei Veränderung nach der Infusion statt. In der NaCl-Gruppe ist ein leichter unspezifischer Anstieg 10 Minuten nach der Infusion auf 6,1 ∓ 1,4 IU/ml und ein geringer Wiederabfall auf 5,8 ∓ 1,3 IU/ml 120 Minuten nach Infusion zu verzeichnen (Tab. 13).

Zwischen der Seretin^R-Gruppe und der NaCl-Gruppe finden während des Meßzeitraumes keine signifikanten Veränderungen in den α_2-Makroglobulin-Aktivitäten statt (Abb. 14).

	kurz vor Infusion	10 Min. nach Infusion	120 Min. nach Infusion
Seretin^R-Gruppe n = 14 x ∓ s (IU/ml)	5,3 ∓ 1,9	5,3 ∓ 1,7	5,3 ∓ 1,6
NaCl-Gruppe n = 8 x ∓ s (IU/ml)	5,7 ∓ 1,1	6,1 ∓ 1,4	5,8 ∓ 1,4

Tab. 13: α_2-Makroglobulin-Aktivität im Plasma vor und nach Infusion von 250 ml Seretin^R (Seretin^R-Gruppe) und 250 ml 0,9%-iger NaCl-Lösung (NaCl-Gruppe)

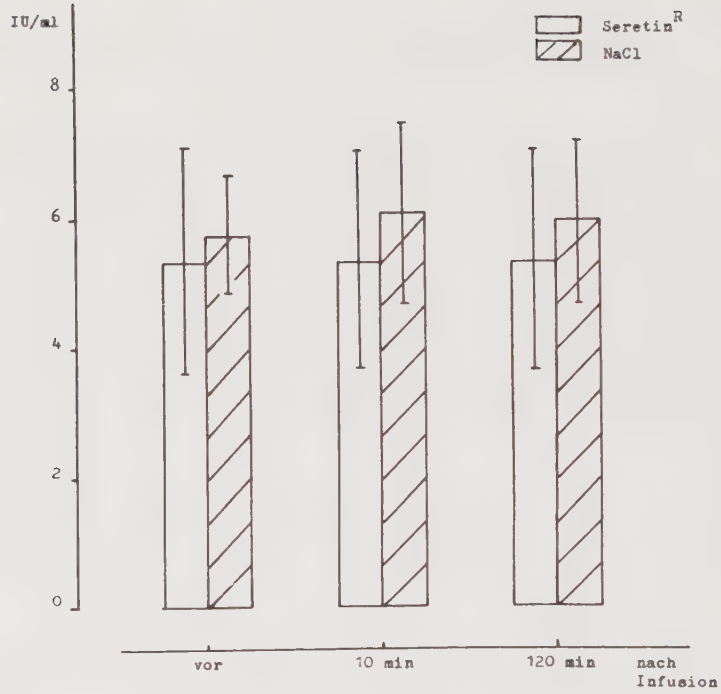


Abb. 14: α_2-Makroglobulin-Aktivität im Plasma: Vergleich zwischen Seretin^R-Gruppe (n = 14) und NaCl-Gruppe (n = 8)

8) α_1-Antitrypsin

Die inhibitorische Aktivität von α_1-Antitrypsin wurde mittels dem chromogenen Substrat Benzoyl-D,L-arginin-p-nitroanilid (BAPA) gemessen.

Als Richtwerte für den Normbereich werden für die Bestimmung bei 25° Celsius Werte zwischen 1,4 und 2,1 IU/ml entsprechend einer Konzentration von 190 bis 300 mg/100 ml angegeben.

Die Ausgangsaktivität in der Seretin^R-Gruppe liegt mit 1,3 ± 0,3 IU/ml etwa 0,1 IU/ml unterhalb des Normalbereiches. In der NaCl-Gruppe liegen die Ausgangswerte bei 1,5 ± 0,2 IU/ml.

10 Minuten nach Infusion wird in beiden Gruppen ein Abfall der α_1-Antitrypsin-Aktivität gemessen: nach Seretin^R auf 1,2 ± 0,3 IU/ml, nach 0,9%-iger NaCl-Lösung auf 1,3 ± 0,2 IU/ml. Zum Zeitpunkt 120 Minuten nach Infusion werden wieder Werte gemessen, die den Ausgangsaktivitäten entsprechen (Tab. 14, Abb. 15).

Die statistische Auswertung ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen der Seretin^R-Gruppe und der NaCl-Gruppe.

	kurz vor Infusion	10 Min. nach Infusion	120 Min. nach Infusion
Seretin^R-Gruppe n = 14 $\bar{x}$ ± s (IU/ml)	1,3 ± 0,3	1,2 ± 0,3	1,3 ± 0,3
NaCl-Gruppe n = 8 $\bar{x}$ ± s (IU/ml)	1,5 ± 0,2	1,3 ± 0,2	1,4 ± 0,2

Tab. 14: α_1-Antitrypsin-Aktivität im Plasma vor und nach Infusion von 250 ml Seretin^R (Seretin^R-Gruppe) und 250 ml 0,9%-iger NaCl-Lösung (NaCl-Gruppe)

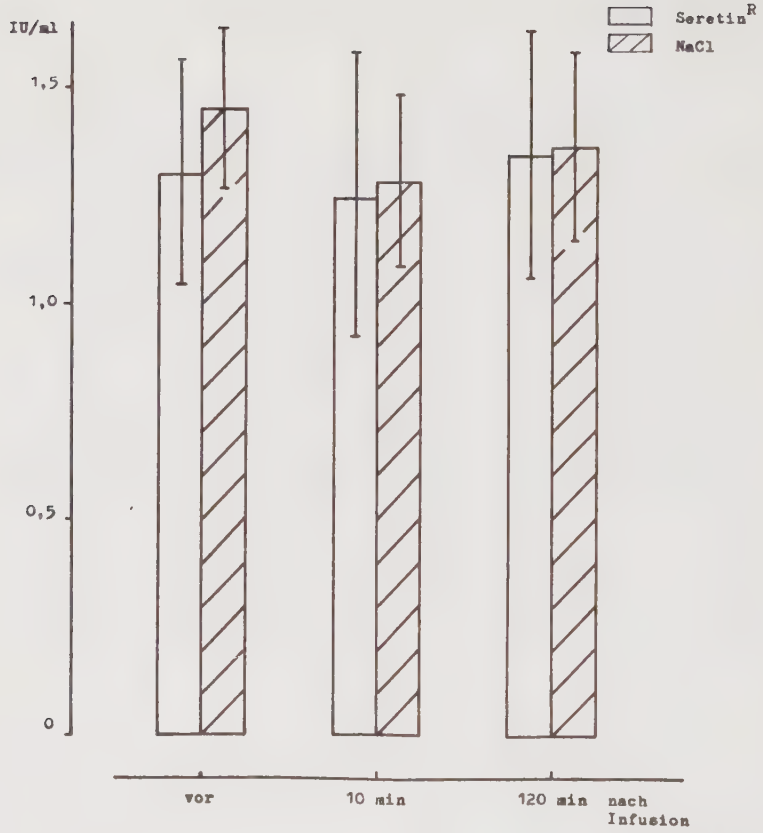


Abb. 15: α_1-Antitrypsin-Aktivität im Plasma:
Vergleich zwischen Seretin^R-Gruppe (n = 14) und
NaCl-Gruppe (n = 8)

E DISKUSSION

1) Prekallikrein und Kallikrein

Der Gehalt an vasoaktiven Enzymen des Kontaktaktivierungssystems in Immunglobulinpräparaten wurde in verschiedenen Arbeiten beschrieben. Kallikrein und Prekallikrein-Aktivator (Hageman-Faktor-Fragmente) wurden zuerst in Präparaten mit Antihämophilie-Faktoren, die mit Ätherfraktionierung hergestellt wurden, identifiziert (39, 106). Neuere Arbeiten von ALVING (1o) und RÖMER (141) weisen erneut auf den zum Teil sehr hohen Gehalt an Prekallikrein-Aktivator und Kallikrein in Immunglobulinpräparaten, die mit Polyäthylenglykol hergestellt warden, hin.

Bei dieser Untersuchung wurde die Serumkonserve Seretin^{R} auf ihren Gehalt an Proteinen des Kallikrein-Kinin-Systems, des fibrinolytischen Systems und des inhibitorischen Systems analysiert. Verschiedene Chargen des gleichen Produkts wurden zuvor von WOLLMANN (183) auf die Aktivität und Konzentration verschiedener Serumproteine, einschließlich der hier untersuchten Proteine, analysiert. Hierbei fanden sich Aktivitäten von Pre-Kallikrein zwischen 0,72 und 1,92 % in Bezug auf das gesamt aktivierbare Kallikrein und Kallikrein-Aktivitäten von 60,65 bis 81,18 U/l.

In den beiden jetzt untersuchten Seretin^{R}-Konserven verschiedener Chargen fanden sich Prekallikrein-Werte von 4,5 und 11,4 % des mit Plasma-Prekallikrein-Aktivator aktivierbaren Kallikrein eines Normalplasmas. Kallikrein-Aktivitäten wurden mit 31,1 und 44,6 U/l bestimmt.

Hinsichtlich der unterschiedlich gefundenen Werte ergeben sich Fragen zum angewendeten Bestimmungsverfahren. So ist bekannt, daß auch Prekallikrein-Aktivator gegenüber dem in der Messung von Prekallikrein und Kallikrein verwendeten chromogenen Sub-

strat S-2302 eine gewisse Aktivität besitzt (9). Die gemessenen Werte können daher auch von dem nicht bestimmten Gehalt an Prekallikrein-Aktivator abhängig sein.

Auf der anderen Seite erfaßt die zur Kallikrein-Bestimmung eingesetzte Methode auch Proteine bzw. Proteasen, die eine dem Kallikrein ähnliche Aktivität besitzen (52, 96). Nach Hemmung mit dem Kallikrein spezifischen Proteasenhemmer Trasylol^{R} fand STEPHAN (169) nur eine geringe Hemmung der Kallikrein-"like-Aktivität" gegenüber dem Substrat S-2303 in einer auch von WOLLMANN (183) untersuchten Serumkonserve. Erst nach Zugabe eines Breitbandinhibitors konnte keine Aktivität mehr gemessen werden. Ein Grund für die fehlende Hemmwirkung des Trasylol^{R} kann in der Anwesenheit von α_2-Makroglobulin in den gemessenen Proben liegen. Es ist bekannt, daß Enzyme wie das Kallikrein vor der Wirkung von Proteasenhemmern geschützt sind, wenn sie im Komplex mit α_2-Makroglobulin vorliegen (66).

Der geringe Prekallikrein-Gehalt in den untersuchten Konserven spricht für eine Aktivierung des im Poolplasma enthaltenen Prekallikreins zu Kallikrein während des Herstellungsverfahrens.

Inwieweit laborchemisch Veränderungen in den Konzentrationen bzw. Aktivitäten von Prekallikrein bzw. Kallikrein nach der Infusion einer Seretin^{R}-Konserve zu verzeichnen sind, wurde im Vergleich zu einer Infusion mit der gleichen Menge einer 0,9%-igen NaCl-Lösung untersucht.

Hierbei fanden sich in den untersuchten Plasmen der Seretin^{R}-Gruppe keine signifikanten Veränderungen der Prekallikrein-Konzentration, in der NaCl-Gruppe ein nicht signifikanter Abfall nach Infusion, der am ehesten ein Verdünnungseffekt sein dürfte.

Ähnliche Ergebnisse mit leicht erhöhten Kallikrein-Ausgangswerten in beiden untersuchten Gruppen, aber keinen signifikanten Unterschieden zwischen den Gruppen, ergaben sich bei der

Messung der Kallikrein-Aktivitäten. Die erhöhten Werte beruhen wahrscheinlich auf einer Kälteaktivierung durch den Einfrier- und Auftauprozeß während der Probenaufbereitung. Eine derartige Aktivierung des Kallikreins wird von GALLIMORE (52) für das angewandte Bestimmungsverfahren beschrieben.

Angesichts der kleinen Probandenanzahl und der in der Literatur angegebenen Raten schwerer Nebenwirkungen von weniger als 0,o1 % nach Infusion von Serumkonserven (138, 169), konnte in dieser Untersuchung nicht ausgeschlossen werden, daß bei einzelnen Empfängern eine Aktivierung des Kallikrein-Kinin-Systems stattfindet. Gerade bei Personen, die schon vor Infusion eines derartigen Produkts eine gewisse Labilität homöostatischer Systeme aufweisen, könnte die Zufuhr einer Kallikrein-haltigen Lösung zu einer Aktivierung folgender vier Systeme führen:

1) dem Gerinnungssystem über den Hageman-Faktor (Faktor XII),
2) dem HMW-Kininogen: Entstehung des Bradykinins (Blutdruckabfall),
3) dem Plasminogen zu Plasmin, wodurch die Fibrinolyse eingeleitet wird,
4) dem Komplementsystem: Entstehung des Anaphylatoxin C3a und C5a.

2) Plasminogen

Die in der Seretin^{R}-Konserve gemessenen Plasminogen-Aktivitäten gegenüber dem chromogenen Substrat S-2251 liegen ca. 20 bis 30 % über den von WOLLMANN (183) in verschiedenen Chargen des gleichen Präparates gemessenen Aktivitäten von 44 bis 55 %. Die immunologische Konzentrationsbestimmung ergab in der Untersuchung von WOLLMANN (183) wesentlich geringere Werte als dies der Aktivitätsbestimmung entsprechen würde. Als Erklärung erscheint eine Veränderung der Molekularstruktur des Plasminogens möglich, wobei die proteolytische Aktivität bei immunologisch verminderter Nachweisbarkeit erhalten bliebe. Auch könnte eine Protease mit Plasminogen-ähnlicher Aktivität gegenüber dem chromogenen Substrat in der Konserve vorliegen.

Die Infusion eines Präparates mit hoher Plasminogen-Aktivität könnte in bestimmten Situationen, z.B. bei Hypoxie, Acidose, bei Aktivierung des Kallikrein-Kinin-Systems oder bei vermindertem Gehalt an Proteasen-Inhibitoren zu einer Aktivierung der Fibrinolyse führen. Zusätzlich könnte eine Aktivierung der Fibrinolyse durch die exogene Zufuhr von Kallikrein zustande kommen. In diesem Fall müßte dann eine Verminderung des Plasminogens meßbar sein.

Um diesen Fragen nachzugehen, wurden die Plasminogenkonzentration im Plasma vor und nach Infusion von 250 ml Seretin^{R} (Seretin^{R}-Gruppe) und 250 ml 0,9%-iger NaCl-Lösung (NaCl-Gruppe) gemessen.

Die gemessenen Konzentrationen waren vor der jeweiligen Infusion in beiden Gruppen um 13 bzw. 19 % gegenüber der Norm erhöht. Die Infusion von Seretin^{R} und 0,9%-iger NaCl-Lösung führte zu keiner signifikanten Veränderung der Plasminogen-Konzentrationen. Die in der NaCl-Gruppe gefundene unspezifische Plasminogen-Verminderung dürfte von einem Verdünnungseffekt durch das infundierte Volumen herrühren.

3) Inhibitorisches System

Der Gehalt der Seretin^{R}-Konserve an Proteinen aus dem inhibitorischen System liegt zum Teil wesentlich unter dem eines normalen Plasmas. Gefunden wurden Werte für Antithrombin III von 0,26 bzw. 2,0 IU/ml, für Antiplasmin von 59,1 bzw. 46,8 % der normalen Humanplasma-Konzentration und für α_2-Makroglobulin von 0,9 bzw. 1,0 IU/ml. Die Aktivitätsmessung von α_1-Antitrypsin ergab für die beiden untersuchten Chargen keine nachweisbaren Werte.

Als Referenzwerte für die Antithrombin-III-Aktivität gegenüber dem chromogenen Substrat Chromozym^{R}TH werden für die Messung

bei 25° Celsius 10 bis 15 IU/ml angegeben (16). Der geringe Gehalt von höchstens 20 % der erwünschten Antithrombin-III-Aktivität läßt die Infusion der Serumkonserve bei Antithrombin-III-Mangelzuständen fragwürdig erscheinen. WOLLMANN (183) konnte in seiner Untersuchung Antithrombin III weder immunologisch noch durch Aktivitätsmessung nachweisen und vermutet daher eine bewußte Änderung des verwendeten Poolplasmas, zumal er in einer Serumkonserve eines anderen Herstellers wesentlich höhere Konzentrationen und Aktivitäten nachweisen konnte.

Die Konzentrationen von α_2-Makroglobulin und α_1-Antitrypsin in 250 ml Seretin^R wird laut Hersteller (16o) mit 320 mg bzw. 30 mg bei einem Gesamtgehalt von 0,4 g Protein aus dem inhibitorischen System angegeben. Die gefundenen Aktivitäten von α_2-Makroglobulin entsprechen einer Konzentration von etwa 30 mg/1oo ml und liegen damit weit unter den erwarteten Werten. Ähnliche Unterschiede zwischen biologischer Aktivität und immunologisch bestimmter Konzentration werden bei Wollmann (183) beschrieben. Es muß angenommen werden, daß der überwiegende Anteil des α_2-Makroglobulins und das gesamte α_1-Antitrypsin während des Herstellungsprozesses seine inhibitorische Aktivität eingebüßt hat. Da bei infektiösen Prozessen vermehrt Proteasen-Inhibitoren benötigt werden, wäre ein möglichst hoher Anteil an frei verfügbarem α_1-Antitrypsin und α_2-Makroglobulin in den Serumkonserven erwünscht (133). Dies ist durch die Gabe der Serumkonserve Seretin^R nicht gewährleistet.

Die Infusion der Serumkonserve führte im Vergleich zu der Infusion einer 0,9%-igen NaCl-Lösung zu keiner signifikanten Steigerung der Antithrombin-III-Aktivitäten in den untersuchten Plasmen. Eine Substitution bei Antithrombin-III-Mangel ist durch den Einsatz des verwendeten Präparats demnach nicht zu erreichen.

Das gleiche gilt für die anderen untersuchten Proteine des inhibitorischen Systems. Trotz des relativ hohen Gehalts

von 64,8 bzw. 59,1 % der normalen Antiplasmin-Konzentration in der Serumkonserve, trat nach Infusion keinerlei signifikanter Anstieg der Antiplasmin-Konzentration in den untersuchten Plasmen ein. Wahrscheinlich wird auf Grund des Herstellungsverfahrens das Antiplasmin-Protein derartig verändert, daß es im Empfängerorganismus als fremdes Protein erkannt, inaktiviert und eliminiert wird.

Die minimale meßbare α_2-Makroglobulin-Aktivität der Konserve läßt a priori keine wesentliche Aktivitätsänderung beim Empfänger erwarten. Tatsächlich war nach der Infusion des Seretin^R im Vergleich zu der NaCl-Gruppe keine signifikante Erhöhung oder Erniedrigung der α_2-Makroglobulin-Aktivität eingetreten.

Das laut Herstellerangaben in Seretin^R enthaltene α_1-Antitrypsin führte im Vergleich zu NaCl-Lösung zu keiner Erhöhung der α_1-Antitrypsin-Aktivitäten in den untersuchten Plasmen.

Der Einsatz der untersuchten Konserve erscheint auf Grund der hier gefundenen Ergebnisse, zumindest für die Indikationsbereiche, bei denen eine Bereitstellung dieser wichtigen Proteine erwünscht wäre, nicht gerechtfertigt.

F ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wird die Humanserumkonserve Seretin^R auf die Konzentration bzw. Aktivität folgender Proteine aus dem Kallikrein-Kinin-, dem fibrinolytischen und dem inhibitorischen System untersucht: Prekallikrein und Kallikrein, Plasminogen, Antithrombin III, Antiplasmin, α_2-Makroglobulin und α_1-Antitrypsin. Die Aktivitäts- bzw. Konzentrationsbestimmung erfolgte mittels der durch die Proteine katalysierten Abspaltung von p-Nitroanilin aus verschiedenen chromogenen Substraten.

Es konnte gezeigt werden, daß in dem Präparat bei geringer Prekallikrein-Konzentration relativ hohe Kallikrein-Aktivitäten vorhanden sind. Kallikrein, ein Enzym des Kontaktaktivierungssystems der Blutgerinnung, wird für verschiedene Nebenwirkungen, so vor allem für die beobachteten Blutdruckabfälle nach der Gabe von Humanproteinpräparaten verantwortlich gemacht.

Der Gehalt an Plasminogen liegt in den untersuchten Konserven bis zu 40 % unter der normalen Plasmakonzentration. An Proteinen aus dem inhibitorischen System findet sich nur Antiplasmin in ausreichender Menge in dem Präparat. Antithrombin III, α_2-Makroglobulin und α_1-Antitrypsin liegen in der Seretin^R-Konserve weit unter den normalen Plasmaspiegeln oder sind wie α_1-Antitrypsin überhaupt nicht mit der Aktivitätsmessung zu erfassen.

Weiterhin wurde untersucht, ob es durch die Infusion der Seretin^R-Konserve zu einer Aktivierung des Kallikrein-Kinin-Systems oder zur Fibrinolyse kommt, und ob ein Einfluß auf die Aktivität der Proteine des inhibitorischen Systems besteht.

Dabei zeigte sich im Vergleich zu einer Infusion einer gleichen Menge 0,9%-iger NaCl-Lösung in einem Kollektiv von

22 Probanden, davon 14 in der Seretin^{R}-Gruppe und 8 in der NaCl-Gruppe, keine signifikante Veränderung des Prekallikreins, Kallikreins und Plasminogens in den untersuchten Plasmen. Die Messung der Proteine aus dem inhibitorischen System zeigte, daß durch die Infusion der Serumkonserve weder eine signifikante Aktivitätsvermehrung zu erreichen ist, noch ein Verbrauch inhibitorischer Aktivitäten induziert wird.

G LITERATURVERZEICHNIS

1) Aasen, A.O.: Studies on Components of the Plasma Kallikrein-Kinin System in Plasma-Samples from Normal Individuals and Patients with Septic Shock. Advances in Shock Research 4. Ed.: A. Lener, Alan R. Liss. Inc. (New York), 1 - 10 (1980).

2) Abdildgaard, U.: Purification of Two Progressive Antithrombins of Human Plasma. Scan. J. Clin. Lab. Invest. 19, 190 - 195 (1967).

3) Abildgaard, U.: Highly Purified Antithrombin III with Heparin Cofactor Activity prepared by Disc Electrophoresis. Scan. J. Clin. Lab. Invest. 21, 89 - 91 (1968).

4) Abildgaard, U.: Binding of Thrombin to Anti-Thrombin III. Scan. J. Clin. Lab. Invest. 24, 23 - 27 (1969).

5) Alagille, D. and Soulier, J.P.: Action des Enzymes Protéolytiques sur le Sang Total "in vitro". Modifications des Facteurs de Coagulation et du Complement. Sem. Hop. Paris 32, 355 - 359 (1956)

6) Alkjaersig, N., Fletcher, A.P.; Sherry, S.: The Mechanism of Clot Dissolution by Plasmin. J. Clin. Invest. 38, 1086 - 1095 (1959).

7) Aoki, N.; Moroi, M.; Tachiya, K.: Effects of α_2-Plasmin Inhibitor on Fibrin Clot Lysis. Its. Comparison with α_2-Makroglobulin. Thromb.Haemost. 39, 22 - 31 (1978).

8) Aoki, N.; Ymanaka, T.: The α_1-Plasmin Inhibitor Levels in Liver Disease. Clin. Chim. Acta 84, 99 - 105 (1978).

9) Alving, B.M.; Hojima, Y.; Pisano, J.J.; Mason, B.L.; Buchingham Jr, R.E.; Mozen, M.M.; Finlayson, J.S.: Hypotension Associated with Prekallikrein Activator (Hageman Factor Fragments) in Plasma Protein Fractions. N.Engl. J. Med. 299, 66 - 70 (1978).

10) Alving, B.M.; Tankesley, D.L.; Mason, B.L.; Rossi, F.; Aronson, D.L.; Finlayson, J.S.: Contact-Activated Factors: Contaminants of Immunglobulin Preparations with Coagulant and Vasoactive Properties. J. Lab. Clin. Med. 96, 334 - 346 (198o).

11) Barandun, S., Morrell, A.; Skvaril, T.: Clinical Experiences with Immunglobulin for Intravenous Use. In: Alving, Finlayson (Eds.), Immunglobulins: Characteristics and Uses for Intravenous Preparations, pp. 31 - 35, US Dept. Health Human Service (FDA) -80-9005 (1979).

12) Barret, A.J.; Starkey, P.M.; Mumm, E.A.: The Unique Nature of the Interaction of α_2-Makroglobulin with Proteases. In: Fritz, H.; Tschesche, H.; Green, L.J.: Truscheit, E. (Eds.): Proteinase Inhibitors. Springer Verlag, Berlin, 72 - 77 (1974).

13) Bauer, H.W.; Mellin, H.E.: Serumkonserve zur Prophylaxe von Komplikationen nach abdominal-chirurgisch urologischen Eingriffen. In: J.R. Kalden und U.D. Koenig: Blutkomponenten und Plasmaersatzmittel. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 102 - 106 (1982).

14) Biggs, R.; Denson, K.W.E.; Akman, N.; Barret, R.; Haddon, M.: Antithrombin III, Antifactor Xa und Heparin. Br. J. Haematol. 19, 283 - 305 (197o).

15) Bleich, H.L.; Bora, E.S.: Actions and Ingeractions of Antithrombin and Heparin. N. Engl. J. Med. 292, 146 - 151 (1975)

16) Boehringer Mannheim GmbH.
Laborvorschrift Antithrombin III.

17) Boehringer Mannheim GmbH.
Laborvorschrift α_2-Makroglobulin.

18) Boehringer Mannheim GmbH.
Laborvorschrift α_1-Antitrypsin.

19) Boehringer Mannheim GmbH.
Coagulation Diagnostika, Precichrom I/II.

20) Brade, V.; Nicholson, A.; Bitter-Suermann, D.; Hadding, U.: Formation of C3-cleaving Properidin Enzyme on Zymosan. Demonstration the Factor D is Replaceable by Proteolytic Enzymes. J. Immunol. 113, 1735 - 1743 (1974).

21) Braunstein, K.M.; Eurenius, K.: Minimal Heparin Cofactor Activity in Disseminated Intravascular Coagulation and Cirrhosis. Am. J. Clin. Pathol. 66, 488 - 494 (1976).

22) Bundy, H.F. and Mehl, J.W.: Trypsin Inhibitors of Human Serum. J. Biol. Chem. 234, 1124 - 1128 (1959).

23) Burrowes, C.E.; Habal, F.M. and Movat, H.Z.: The Inhibition of Human Plasma Kallikrein by Antithrombin III. Thromb. Res. 7, 175 - 183 (1975).

24) Carrel, R.W.; Jeppson, J.-O.; Laurell, C.-B.; Brennan, S.O.; Owen, M.C.; Vaughan, L. and Boswell, D.R.: Structure and Variation of Human α_1-Antitrypsin. Nature 298, 329 - 334 (1982)

25) Christensen, U.; Clemmensen, J.: Kinetic Properties of the Primary Inhibitor of Plasmin from Human Plasma. Biochem. J. 163, 389 - 391 (1977).

26) Christensen, U.; Clemmensen, J.: Purification and Reaction Mechanism of the Primary Inhibitor of Plasmin from Human Plasma. Biochem. J. 175, 635 - 641 (1978).

27) Cleason, C.; Friberger, P.; Knös, M.; Eriksson, E.: Methods for Determination of Prekallikrein in Plasma, Glandular Kallikrein and Urokinase. Haemostasis 7, 76 - 78 (1978).

28) Cochrane, C.G.; Revak, S.D.; Wuepper, K.D.; Johnston, A.; Morrison, D.C.; Uleviten, R.: Soluble Mediators of Injury of Microvasculature; Hageman Factor and Kinin Forming Intrinsic Clotting and Fibrinolytic System. Microvasc. Res. 8, 112 - 121 (1974).

29) Collen, D.: Identification and Some Properties of a New Fast-Reacting Plasmin Inhibitor in Human Plasma. Eur. J. Biochem. 69, 209 - 216 (1976).

30) Collen, D.; Wiman, B.: Turnover of Antiplasmin, the Fast-Reacting Plasmin Inhibitor of Plasma. Blood 53, 313 - 324 (1979).

31) Colman, R.W.: Activation of Plasminogen by Human Plasma Kallikrein. Biochem. Biophys. Res. Commun. 35, 273 - 279 (1969).

32) Crawford, I.P.: Purification and Properties of Normal Human Antitrypsin. Arch. Biochem. Biophys. 156, 215 - 222 (1973).

33) Damus, P.S.; Hicks, M.; Rosenberg, R.D.: Anticoagulant Action of Heparin. Nature 246, 355 - 357 (1973).

34) Damus, P.S.; Garni, A.; Wallace, G.A.: Immunologic Measurement of Antithrombin III - Heparin Cofactor and α_2-Makroglobulin in Disseminated Intravascular Coagulation and Hepatic Failure Coagulopathy. Thromb. Res. 6, 27 - 38 (1975).

35) Denk, S.; Eisen, V.; Blümel, G.: Effect of Organic Kallikrein on Blood Coagulation, Complement and Esterolytic Activity of Plasmin. In: Kininogenases - Kallikrein III, G.L. Haberland, J.W. Rowen, G. Blümel, P. Huber (Eds.), 41 - 53. F.K. Schattauer, Stuttgart - New York (1975).

36) Deutsch, E.; Thaler, E.: Acquired Antithrombin III (AT III) Deficiency in Septicaemia. Throm. Haemost. 42, 375 (1979).

37) Donaldson, V.H.: Effect of Plasmin in vitro on Clotting Factors in Plasma. J. Lab. Clin. Med. 56, 544 - 651 (196o).

38) Dusswald, K.H.; Ring, J.: Immunglobuline zur Frühtherapie von postoperativen Infektionen. Ergebnisse einer kontrollierten Studie. In: Deicher, H.; Stroehman, J. (Eds.): Immunglobulintherapie. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 126 (198o).

39) Eisen, V.: Studies on Fibrinogen Fractions Isolated from Human Plasma by Precipitation with Cold Ether II. Enzymic Activities Resembling. Br. J. Haematol. 11, 576 (1965).

40) Edy, J.; de Cock, T.; Collen, D.: Inhibition of Plasmin by Normal and Antiplasmin Depleted Plasma. Thromb. Res. 8, 513 (1976).

41) Erdös, E.G.: Angiotensin I Converting Enzyme. Circ. Res. 36, 247 - 255 (1975).

42) Fagerhol, M.K.; Abildgaard, U.: Immunological Studies on Human Antithrombin III. Influence of Age, Sex and Use of Oral Contraceptives on Serum Concentration. Scand. J. Haematol. 7, 10 - 17 (197o).

43) Frey, E.K.; Kraut, H.: Ein neues Kreislaufhormon und seine Wirkung. Arch. Exp. Path. Pharmacol. 133, 1 - 56 (1928).

44) Friberger, P.; Knös, M.; Gustavsson, S.; Aurell, L.; Claeson, G.: Methods for Determination of Plasmin, Antiplasmin and Plasminogen by Means of Substrate S-2251. Haemostasis 7, 138 (1978).

45) Friberger, P.: Determination of Prekallikrein in Plasma by Means of a Chromogenic Tripeptide Substrate for Plasma Kallikrein. In: Kinins II, Biochemistry, Pathophysiology and Clinical Aspects. Tujii, S.; Moriya, H.; Suzuki, T. (Eds.), Plenum Publishing Corp., New York, 67 - 82 (1979).

46) Friberger, P.; Knös, M.: Plasminogen Determination in Human Plasma. Chapter 13 in Chromogenic Peptide Substrates. Ed. Scully, M.T. and Kakkar, V.V., Churchill Livingston (1979).

47) Fritz, H.: Proteinase Inhibitors in Severe Inflammatory Processes (Septic Shock and Experimental Endotoxemia): Biochemical, Pathophysiological and Therapeutic Aspects. In: Protein Degradation in Health and Disease, 351 - 379. Ciba Found. Symp. 75 (New Series), Experta Med. Amsterdam (1980

48) Frommhagen, L.H.; Tudenberg, H.: The Role of Aggregated Gamma-Globulins in the Anticomplementary Activity of Human and Animal Sera. J. Immunol. 89, 336 - 343 (1962).

49) Gallimore, J.J.: Serum Inhibitors of Fibrinolysis. Br. J. Haematol. 31, 217 - 231 (1975).

50) Gallimore, M.J.; Amundsen, E.; Larsbraaten, M.; Lyngaas, K.; Fareid, E.: Studies on Plasma Inhibitors of Plasma Kallikrein Using Chromogenic Peptide Substrate Assays. Thromb. Res. 16, 695 - 703 (1979).

51) Gallimore, M.J.: Further Studies on Components of the Plasma Kallikrein System in Samples from Cancer Patients and Normal Individuals. In: Progress in Chemical Fibrinolysis and Thrombolysis, Vol V. Ed.: Davidson, J.F., Raven Press, New York (1980).

52) Gallimore, M.J.; Friberger, P.: Simple Chromogenic Peptide Substrate Assays for Determinating Prekallikrein, Kallikrein Inhibition and Kallikrein "like" Activity in Human Plasma. Thromb. Res. 25, 293 - 298 (1982).

53) Ganroth, P.O.: Determination of α_2-Makroglobulin as Trypsin-protein Esterase. Clin. Chim. Acta 14, 493 - 501 (1966).

54) Ganroth, P.O.: Inhibition of Plasmin Activity by α_2-Makroglobulin. Clin. Chim. Acta 16, 328 - 330 (1967).

55) Ganroth, P.O.; Scherstein, B.: Serum α_2-Makroglobulin Concentration and its Variation with Age and Sex. Clin. Chim. Acta 15, 113 - 120 (1967).

56) Gans, H.; Tan, B.H.: α_1-Antitrypsin, an Inhibitor for Thrombin and Plasmin. Clin. Chim. Acta 17, 111 - 117 (1967).

57) Gebrauchsinformation Endoglobulin, Immunglobulin Human zur intravenösen Anwendung.
Österreichisches Institut für Hämoderivate Ges.m.b.H. 010280/196.

58) Gebrauchsinformation Immunglobulin 7S human intravenös. Armour Pharma, D-4150 Krefeld, Stand 1981.

59) Geursen, R.G.; Kroh, U.; Krump, W.; Scharfe, B.: Ursache von Nebenwirkungen bei der Anwendung von intravenös applizierbaren Immunglobulinen. In: T.R. Seiler und G. R. Geursen. Beitr. Infusionther. Klinis. Ernähr., Vol. 9, 95 - 114, Karger Basel (1982).

60) Ghebrehiwet, B.; Silverberg, M.; Kaplan, A.P.: Acivation of the Classical Pathway of Complement by Hageman Factor Fragment. J. Exp. Med. 153, 665 - 676 (1981).

61) Gigli, J.; Mason, J.W.; Colman, R. W.; Austen, K.F.: Interaction of Kallikrein with $C\bar{1}a$-Esterase Inhibitor (C1aINH). J. Immunol. 104, 574 - 581 (1970).

62) Godal, H.C.; Rygh, M.; Laake, K.: Progressive Inactivation of Purified Factor VII by Heparin and Antithrombin III. Thromb. Res. 5, 773 - 775 (1974).

63) Gottlob, R.M.; Matlausch, K.; Porschinski, R.: The Possible Role of Leucocytes in Spontaneous and Induced Thrombolysis and Some Properties of Leucocytes Proteases. In: J.F. Davidson, M.M. Samana, P.C. Desnoyers (Eds.). Progress in Chemical Fibrinolysis and Thrombolysis, Vol III. Raven Press, New York (1978).

64) Haakenstad, A.O.; Manni, M.: The Biology of Immune Complexes. In: Takal (Ed.), Autoimmunity, Chap. II, 277, Academic Press, New York (1977).

65) Haberland, G.L.: The Role of Kininogenase Inhibition in Post Traumatic Shock and Related Conditions. Klin. Wschr. 56, 325 - 331 (1978).

66) Harpel, P. C.: Human Plasma α_2-Makroglobulin. An Inhibitor of Plasma Kallikrein. J. Exp. Med. 132, 329 - 352 (1970).

67) Harpel, P.C.: Studies on Human Plasma α_2-Makroglobulin-Enzyme Interactions. J. Exp. Med. 138, 508 - 521 (1973).

68) Harpel, P.C.: Human α_2-Makroglobulin. In: Lorand, L. (Ed.), Methods in Enzymology, Academic Press, New York, Vol. 45, 639 - 652 (1976b).

69) Harpel, P.C.; Rosenberg, R.D.. α_2-Makroglobulin and Antithrombin III- Heparin Cofactor: Modulators of Hemostatic Inflammatory Reactions. Prog. Hemost. Thromb. 3, 145 - 189 (1976).

70) Heck, L.W. and Kaplan, A.P.: Substrates of Hageman Factor. Isolation and Characterisation of Human Factor XI (PTA) and Inhibition of the Activated Enzyme by α_1-Antitrypsin. J. Exp. Med. 14o, 1615 - 1630 (1974).

71) Heide, K.; Heimburger, N.; Haupt, H.: An Inter- Alpha Trypsin Inhibitor of Human Serum. Clin. Chim. Acta 11, 82 - 85 (1965).

72) Heimburger, N.; Haupt, H.; Schwick, H.G.: Proteinase Inhibitors in Human Plasma. In: Proceedings of the Intern. Research Conference on Proteinase Inhibitors, 1 - 22, Munich (1970).

73) Hesse, R.; Tritschler, W.; Castelfranchi, G.; Bablock, W.: Antithrombin III: Referenzwerte mit einem chromogenen Substrat (Chromozym TH). Blut 42, 227 - 234 (1981).

74) Hensen, A.; Loelinger, E.A.: Antithrombin III. Its Metabolism and its Function in Blood Coagulation. Thromb. Diath. Haemorrh. 9, Suppl. 1 - 84 (1963).

75) Highsmith, R.F.; Rosenberg, R.D.: The Inhibition of Human Plasmin by Human Antithrombin Heparin Cofactor. J. Biol. Chem. 249, 4335 - 4338 (1974).

76) Hitzig, W.H.: Therapeutische Anwendung von Immunglobulinen bei Kindern. Blut 40, 215 (198o).

77) Hoffmann, K.M.; van den Broek and Jansen, A.P.: Automated Determination of the Antitrypsin Activity of Serum. Clin. Chin. Acta 71, 251 - 259 (1976).

78) Hofstatter, T.; Brammsen, H.; Granski, P.; Sedlacek, H.H.; Seiler, F.R.: Activation of Human Neutrophils by Immune Complexes and IgG Aggregates. Abstr. 14; Int. Leucocyte Culture Conference, Heidelberg (1981).

79) Högstörp, H. and Saldeen, T.: Rat Hepatocytes Synthesize Alpha$_2$-Antiplasmin. Haemostasis 11, Suppl. 1, 46 (1982).

80) Jochum, M.; Witte, J.; Lander, S.; Schliesser, H.; Fritz, H.: Effect of Exogenous Protease Inhibitors on Clotting, Fibrinolytic and Other Factors Degraded in vivo and in vitro by Granulocytic Proteases. 5 th Intern. Conf. of Synthetic Fibrinol. Thrombol. Agents. Progress in Fibrinolysis. Malmö 1980, Abstract Book p. 53.

81) Jochum, M.; Witte, J.; Selbermann, K.H.; Reichdeschel, G.; Fritz, H.: Clotting and Other Plasma Factors in Experimental Endotoxemia. Inhibition of Degradation by Endogenous Proteinase Inhibitors. Eur. Surg. Res. 13, 152 (1981).

82) Jochum, M.; Lander, S.: Limited Proteolysis of Isolated Human α_1-Antichymotrypsin and α_1-Plasmin Inhibitor by Human Granulocytic Elastase. In: Proteinasen und ihre Inhibitoren. Schnells, G. (Ed.) Perimed-Fachbuch, 59 (1983).

83) Joller, P.W.; Baradun, S.; Hitzig, W.: Neue Möglichkeiten der Immunglobulin-Ersatztherapie bei Antikörpermangelsyndrom. Schweiz.Med. Wochenschr. 11o, 1451 - 1453 (1980).

84) Ishizaka, T.; Ishizaka, K.: Biological Activities of Aggregated Gamma Globulin I. Skin Reactive and Complement-Fixing Properties of Denaturated Gamma Globulin. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 101, 845 - 850 (1959).

85) Kalden, J.R.: Immuntherapeutische Möglichkeiten bei Vorbeugung und Behandlung von Infektionskrankheiten. In: Kalden, J-R.; Koenig, U.D. Blutkomponenten und Plasmaersatzmittel. Springer Verlag Heidelberg, 20 - 27 (1982.

86) Kaplan, A.P.; Austen, K.F.: A Pre-Albumin Activator of Prekallikrein. J. Immunol. 105, 802 - 811 (197o).

87) Kaplan, A.P.; Austen, K.F.: A Prealbumin Activator of Prekallikrein II. Derivation of Activators of Prekallikrein from Active Hageman Factor by Digestion with Plasmin. J. Exp. Med. 133, 696 - 712 (1971),

88) Kaplan, A.P.; Austen, K.F.: The Fibrinolytic Pathway of Human Plasma. Isolation and Characterisation of Plasminogen Proactivator. J. Exp. Med. 136, 1378 - 1393 (1972),

89) Kaplan, A.P.; Schreiber, A.D.; Austen, K.F.: Isolation and Reaction Mechanisms of Human Plasminogen Activator and Its Precusors. Fed. Proc. 31, 624 a (1972).

90) Kaplan, A.P.; Meier, H.L. and Mandle, R.: The Hageman Factor Dependent Pathways of Coagulation, Fibrinolysis and Kinin Formation. Semin. Thromb. Hemost. 3, 1 (1976).

91) Klauser, R.J.; Blümel, G.: Zur Bestimmung der Kallikreinausscheidung im Urin. Med. Welt 31, 521 - 522 (198o).

92) Klingemann, H.G.; Egbring, H.; Holst, F.; Granse, M.; Havemann, E.: Digestion of α_2-Antiplasmin Inhibitor by Neutral Proteases from Human Leucocytes. Thromb. Res. 24, 479 - 483 (1981).

93) Kueppers, F. and Tallat, R.J.: α_1-Antitrypsin Deficiency: a Defect in Protein Synthesis. Clin. Chim. Acta 24, 401 - 403 (1969).

94) Kuwahara, S.S.: Prekallikrein Activator (Hageman Factor Fragment) in Human Plasma-Fraction. Transfusion 2o, 433 - 439 (1980).

95) Laborvorschrift Antiplasmin.
Deutsche Kabi GmbH, München.

96) Laborvorschrift Kallikrein "like" Activity.
Deutsche Kabi GmbH, München.

97) Laborvorschrift Prekallikrein.
Deutsche Kabi GmbH, München.

98) Laurell, C.P.; Jeppsson, J.O.: Protease Inhibitors in Plasma. In: Putnam, F.W. (Ed.); The Plasma Proteins 2nd Edn., Academic Press, New York, Vol. 1, Chap. 5 (1975).

99) Learned, L.A.; Bloom, J.W. and Hunter, M.J.: The Antithrombin Activity of α_1-Protease Inhibitor: The Antitrypsin Activity of Antithrombin III. Thromb. Res. 8, 99 - 109 (1976).

100) Lechner, K.; Thaler, E.; Neissner, H.; Nowotny, C.; Partsch, H Antithrombin III Mangel und Thromboseneigung. Wien. Klin. Wochenschr. 89, 215 - 222 (1977).

101) Loos, M.: Generation of EA C 42 (C3-Convertase) by Proteolytic Enzymes. Fed. Proc. 36, 1209 (1977).

102) Loskutoff, D.J. and Edgington, T.S.: Synthesis of a Fibrinolytic Activator and Inhibitor by Endothelial Cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 3903 - 3907 (1977).

103) Lyttleton, J.W.: The Antithrombin Activity of Heparin. Biochem. J. 58, 15 - 23 (1954).

104) Macfarlane, R.G. and Pilling, J.: Fibrinolytic Activity of Normal Urine. Nature 159, 779 (1964).

105) Mackie, M.; Booth, N.A.; Bennett, B.: Comparative Studies on Human Activators of Plasminogen. Br. J. Haematol. 47, 79 - 90 (1981).

106) Mackay, M.; Maycoc, Wd'A.; Silk, E.; Combrige, B.S.: Studies on Fibrinogen Fractions Isolated from Human Plasma by Precipation with Cold Ether. I. Plasma Kinin Formation by the Activation of Contained Plasminogen. Br. J. Haematol. 11, 563 (1965).

107) Matheson, N.R.; Travis, J.: Inactivation of Human Thrombin in the Presence of Human α_1-Proteinase Inhibitor. Biochem. J. 159, 495 - 502 (1976).

108) Marciniak, E.; Farlex, C.H.; Desimone, P.A.: Familial Thrombosis Due to Antithrombin III Deficiency. Blood 43, 219 - 231 (1974).

109) Marciniak, E.; Glockermann, J.P.: Heparin Induced Decrease in Circulating Antithrombin III. Lancet II, 581 - 586 (1977).

110) Marder, V.J.; Sulman, N.R.; Carrol, W.R.: The Importance of Intermediate Degradation Products of Fibrinogen in Fibrinolytic Haemorrhage. Trans Assoc. Am. Physicians 80, 156 - 167 (1967).

111) Margolius, H.S.; Horwitz, D.; Pisano, J.J.; Keiser, H.R.: Urinary Kallikrein Excretion in Hypertensive Man. Relationship to Sodium Intake and Sodium Retaining Steroids. Circ. Res. 35, 820 - 825 (1974).

112) McBean, L.D.; Smith jr. J.C.; Berne, B.H.; Halsted, J.A.: Serum Zinc and α_2-Makroglobulin Concentration in Myocardial Infarction, Decubitus Ulcer, Multiple Myeloma, Prostatic Carcinoma, Down's Syndrome and Nephrotic Syndrome. Clin. Chim. Acta 50, 43 (1974).

113) Mc Connell, D.J.: Kallikrein in Human Plasma. J. Clin. Invest. 51, 1611 - 1623 (1972).

114) Morawitz, P.: Die Chemie der Blutgerinnung. Ergebnisse der Physiologischen Chemie und Experimentalen Pharmakologie 4, 307 (1905).

115) Morrell, A.; Baradun, S.: Substitution mit Immunglobulinen bei primärem Antikörpermangelsyndrom. In: Seiler, F.R.; Geursen, G.R. (Eds.), Beitr. Infusionsther. Klinis. Ernähr. Vol. 3, 16 - 24, Karger Basel (1982).

116) Moroi, M.; Aoki, M.: Isolation and Characterisation of α_2-Plasmin Inhibitor from Human Plasma. J. Biol. Chem. 251, 5956 - 5965 (1976).

117) Moroi, M.; Aoki, N.: Inhibition of Proteases in Coagulation, Kinin-Forming and Complement Systems by α_2-Plasmin Inhibitor. J. Biochem. 82, 969 - 972 (1977).

118) Mullertz, S.; Clemmensen, J.: The Primary Inhibitor of Plasmin in Human Plasma. Biochem. J. 159, 545 - 553 (1976).

119) Mullertz, S.: Natural Inhibitors of Fibrinolysis. In: Progress in Chemical Fibrinolysis and Thrombolysis, Vol 3; Davidson, J.F.; Rowen, R.M.; Samana, M.M. and Desnoyers, P.C. (Eds.), Raven Press, New York (1978).

120) Nilsson, J.; Cedergren, B.; Wiman, B.: On the Significance of the Two Forms of Human α_2-Antiplasmin with Different Affinity for the Lysine Binding Site in Plasminogen. Haemostasis 11, Suppl. 1, 62 (1982).

121) Nolte, M.F.; Pirofski, B.; Gerritz, G.A.; Golding, B.S.: Intravenous Immunglobulin Therapie for Antibody Deficiency. Clin. Exp. Immunol. 36, 237 - 243 (1979).

122) Oogston, D.; Oogsten, C.M.; Ratnoff, O.D.; Frobes, C.D.: Studies on a Complex Mechanism for the Activation of Plasminogen by Kaolin and Chloroform: The Participation of Hageman Factor and Additional Cofactors. J. Clin. Invest. 48, 1786 - 1801 (1969).

123) Oogston, D.; Bennet, B. and Mackie, M.: Properties of a Partially Purified Preparation of a Circulation Plasminogen Activator. Thromb. Res. 8, 276 - 284 (1976).

124) Oogston, D. and Bennet, B.: Biochemistry of Naturall Occuring Inhibitors of the Fibrinolytic Enzyme System. In: Haemostasis, Oogston, D. and Bennet, B. (Eds.), Chap. 12; John Wiley and Sons, London (1977).

125) Ohlsson, K.; Laurell, C.B.: The Dissappearence of Enzym-Inhibitor Complexes from the Circulation of Man. Clin. Sci. Mol. Med. 51, 87 (1976)

126) Ohlsson, K.; Ohlsson, J.: Neutral Proteases of Human Granulocytes IV. Interaction between Human Granulocyte Collagenase and Human Proteinase Inhibitor. J. Lab. Clin. Med. 89, 269 (1977).

127) Ohlsson, K.: Interaction of Granulocytes Neutral Protease with α_1-Antitrypsin, α_1-Makroglobulin and α_1-Antichymotrypsin. In: K. Haveman; A. Janoff (Eds): Neutral Proteases in Human Polymorphnuclear Leucocytes. Urban a. Schwarzenberg Verlag, Baltimore, Munich, 167 (1978).

128) Pasquini, R. and Hershgold, E.J.: Effects of Plasmin on Human Factor VIII (AHF). Blood 41, 105 - 111 (1973).

129) Pillemer, L.; Ratnoff, O.D.; Blum, L.; Lepow, J.H.: The Inactivation of Complement and its Components by Plasmin. J. Exp. Med. 97, 573 - 589 (1953).

130) Plasminogen, Laborvorschrift. Deutsche Kabi GmbH.

131) Plow, E.F.: The Mayor Fibrinolytic Proteases in Human Leucocytes. Biochem. Biophys. Acta 630, 47 (1980).

132) Putman, F.W.: The Plasma Proteins. Academic Press, New York, San Francisco, London (1975).

133) Proteasen - Antiproteasen in der Klinik. III. Internationales Symposium, Okt. 1982 in Brüssel. Dtsch. Ärzteblatt 5, Ausgabe B (1983).

134) Rabiner, S.F.; Goldfine, J.D.; Hart, A.; Summaria, L.; Robbins, E.C.: Radioimmunoassy of Human Plasminogen and Plasmin. J. Lab. Clin. Med. 74, 265 - 273 (1969).

135) Ratnoff, O.D.; Naff, G.B.: The Conversation of C'1s to C'1 Esterase by Plasmin and Trypsin. J. Exp. Med. 125, 337 - 358 (1979).

136) Ratnoff, O.D.; Pensky, J.; Ogston, D.; Naff, G.B.: The Inhibition of Plasmin, Plasma Kallikrein, Plasma Permeability Factor and C'1r-Subunit of Complement by Serum C'1 Esterase Inhibitor. J. Exp. Med. 129, 803 - 809 (1979).

137) Richerson, H.B.; Seebohm, P.M.: Anaphylactoid Reaction to Human Gamma-Globulin. Arch. Intern. Med. 117, 568 - 572 (1966).

138) Ring, J.: Anaesthesiologie und Infusionsmedizin Bd.III, 1978.

139) Rizza, C. R.: Naturally Occuring Inhibitors of Blood Coagulation. In: The Physiology of Haemostasis. Ogston, D. (Ed.), Chap. 6, Croom Helm 1983.

140) Røka,L.: Bestimmung von Antithrombin III mit dem chromogenen Substrat Chromozym TH. Aktuelle Diagnostik, Boehringer Mannheim (1977).

141) Römer, J.; Morgenthaler, J.-J.; Scherz, R.; Skoaril, F.: Characterization of Various Immunglobulin Preparations for the Intravenous Application. I. Protein Composition and Antibody Content. Vox Sang 42, 62 - 73 (1982).

142) Rosenberg, P.D. and Damus, P.S.: The Purification and Mechanism of Action of Human Antithrombin-Heparin Cofactor. J. Biol. Chem. 248, 6490 - 6505 (1973).

143) Sagarn, S.; Nairn, D.; Stamakis, J.D.; Maffei, F.; Higgins, A.F.; Thomas, D.P.; Kakkar, V.V.: Efficacy of Low Dose Heparin in Prevention of Extensive Deep-Vein Thrombosis in Patients Undergoing Total Hipp Replacement. Lancet 1, 1151 - 1154 (1976).

144) Saito, H.; Goldsmith, G.H.; Moroi, M.; Aoko, N.: Inhibitory Spectrum of α_2-Antiplasmin Inhibitor. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 2013 - 2017 (1979).

145) Saito, H.; Goodenough, L.T.; Knowles, B.B.; Adan, D.P.: Synthesis and Secretion of α_2-Plasmin Inhibitor by Established Human Liver Cell Lines. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 2013 - 2017 (1982).

146) Saito, H.: Normal Hemostatic Mechanisms. In: Disorders of Hemostasis, Ratnoff, O.D.; Frobes, C.D. (Eds.), Grun and Stratton Inc. London, 23 - 39 (1984).

147) Sakata, Y.; Aoki, N.: Cross-Linking of α_2-Plasmin Inhibitor to Fibrin-Stabilization Factor. J. Clin. Invest. 65, 290 - 297 (1980)

148) Sakata, Y.; Aoki, N.: Significance of Cross-Linking of α_2-Plasmin Inhibitor to Fibrin in Inhibition of Fibrinolysis and Haemostasis. J. Clin. Invest. 69, 536 - 542 (1982).

149) Sakuragawa, N. et al.: Changes of Prekallikrein in Cases with Disseminates Intravascular Coagulation Syndrom. In: Kinins II. Systemic Proteases and Cellular Function. Eds.: Fujii, S.; Moriya, H. Suzuki, T.; Plenum Publishing Corp. New York, 185 - 193 (1979).

150) Sale, S.R.; Greenberger, P.A.; Patterson, R.: Idiopathic Anaphylactoid Reactions. A Clinical Summery. J. Am. Med. Assoc. 246, 2336 - 2339 (1981).

151) Sars, G.; Pepper, D.S.: Investigations on Antithrombin III in Normal Plasma and Serum. Br. J. Haematol. 30, 265 - 272 (1975).

152) Schneider, J.; Weitzel, H.: Immunglobuline. Prophylaxe und Therapie. Med. Verlagsgesellschaft, Marburg (1974).

153) Schwander, D.; Wegman, A.: Substitutive Therapie durch intravenöse Infusionen von Standard-Gamma-Globulin bei septischen Zuständen. Schweiz. Med. Wochenschr. 103, 1184 - 1188 (1973).

154) Scully, M.F., Ellers, V.; MacGregor, J.R.; Kakkar, V.V.: Inhibition of Human Factor Xa by Various Plasma Protease Inhibitors. Thromb. Haemost. 46, 90 (1981).

155) Sedlacek, H.H.; Seiler, F.R.: Prophylaxe und Therapie mit Immunglobulinen: Eine kritische Stellungnahme zur Frage der Immunkomplexbedingten Entzündungsreaktion. In: R. Schmidt und J. Stroehmann (Eds): Beitr. Infusionsther. Klinis. Ernähr. Vol. 11, 6 - 19, Karger, Basel 1983.

156) Seegers, W.H.; Marciniak, E.: Inhibition of Autoprothrombin C Activity with Plasma. Nature 193, 1188 - 1190 (1962).

157) Seegers, W.H. Antithrombin as Proteinase Inhibitor. Ann. NY. Acad. Sci. 146, 593 - 600 (1968).

158) Seiler, F.R.; Kanzy, E.J.; Ax, W; Hoffstaetter, T.: Quality Criteria for Intravenous Immunglobulin Preparations with Emphasis on Fc-mediated Functions and Phagocytosis. In: Alding, Finlayson (Eds.) Immunglobulins: Characteristics and Use of Intravenous Preparations. DHHS-Publications No.(FDA)-80-9005, Washington DC, US Government Printing Office, 207 - 217 (1980).

159) Semeraro, N.; Colucci, M.; Telesforo, P.; Collen,D.: The Inhibition of Plasmin by Antithrombin-heparin Complex. I. In Human Plasma in Vitro. Br. J. Haematol. 39, 91 - 99 (1978).

160) Seretin, Behringwerke AG. Med. Information und Vertrieb, Frankfurt (1982).

161) Shamash, Y. and Rimon, A.: The Plasmin Inhibitors of Human Plasma III. Purification and Partial Characterisation. Biochem. Biophys. Acta 121, 35 - 41 (1966).

162) Sottrup-Jensen, L.; Hansen, H.F.; Mortensen, S.B., Petersen, T.E.; Magnusson, S. and Jörnvall, H.: Mechanism of Proteinase-Binding to α_2-Makroglobulin. Thromb. Haemost. 46, 87 (1981).

163) Soria, J. et al.: Dosage du Plasminogen a l'Aide d'un Substrat Chromogène Tripeptide. Patho). Biol. (Paris), 24, 725 (1976).

164) Stathakis, N.; Papayannis, A.G.: Postoperative Antithrombin III Concentration. Lancet I, 430 (1972).

165) Steinbuch, M., Blatrix, C.; Josso, F.: α_2-Makroglobulin as Progressive Antithrombin. Nature 261, 500 - 501 (1967).

166) Steinbuch, M.: Les Antiprotéases du Plasma. Rev. Fr. Transfus. 14, 61 - 82 (1971).

167) Stephan, W.: Intravenöse Immunglobuline. Proteinchemische und immunologische Charakterisierung der verschiedenen Präparatetypen. Arzneim. Forsch./Drug Res. 30, 115 (1980).

168) Stephan, W.: Activity and Storage Stability of Proteins in a Hepatitis free Human Serum Preparation. Arzneim. Forsch./Drug Res. 32, 302 - 305 (1982).

169) Stephan, W.: Leserzuschrift. Infusionstherapie 11, 134 (1984).

170) Stormorken, H. : Chromogenic Substrate Assay of Plasma Kallikrein. With a Note on its Site of Biosynthesis. Haemostasis 7, 69 - 75 (1975).

171) Tatemichi, S.R.; Osmond, D.H.: Factor XII in Endogenous Activation of Inactive Renin. Lancet I, 1313 (1978).

172) Teger-Nilsson, A.C.; Friberger, P.; Gyrander, E.: Determination of a New Rapid Plasmin Inhibitor in Human Blood by Means of Plasmin Specific Tripeptide Substrate. Scand. J. Clin. Lab. Invest. 37, 403 - 409 (1977).

173) Venneröd, A.H.; Laake, K.; Sotberg, A.K.; Strömland, S.: Inactivation and Bindung of Human Plasmin Kallikrein by Antithrombin III und Heparin. Thromb. Res. 9, 457 - 466 (1976).

174) Vetter, R.; Scheler, F.: Evidence for a Role of Plasma Kallikrein in the Activation of Prorenin. Nature 283, 492 - 483 (1980).

175) Walker, J.D. : The Coagulation, Fibrinolytic and Plasma Kallikrein System in Acute Pancreatitis. In: Progress in Chemical Fibrinolysis and Thrombolysis Vol. V, Ed.: Davidson, J.F., Raven Press, New York (1980).

176) Wiggins, R.C.; Bouma, B.N.; Cochrane, C.G.; Griffin, J.H.: Role of High Molecular Weight Kininogen in Surface-Binding and Activation of Coagulation Factor XI and Prekallikrein. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 4636 (1977).

177) Wilding, P.; Adham, N.F.; Mehl, J.W.; Haverbeck, B.J.: Alpha-2-Makroglobulin Concentrations in Human Serum. Nature 214, 1226 - 1227 (1967).

178) Wiman, B. and Wallen, P.: On the Primary Structure of Human Plasminogen and Plasmin. Purification and Characterisation of Cyanogen-Bromid Fragments. Eur. J. Biochem. 57, 387 - 394 (1975).

179) Wiman, B.; Collen, D.: Purification and Characterisation of Human Antiplasmin, the Fast Acting Inhibitor of Plasmin. Eur. J. Biochem. 78, 19 - 26 (1977).

180) Wiman, B.; Collen, D.: On the Kinetics of the Reaction between Human Antiplasmin and Plasmin. Eur. J. Biochem. 84, 573 - 578 (1978).

181) Wiman, B.; Lijnen, H.R.; Collen, D.: On the Specific Interaction between the Lysine Binding Sites in Plasmin and Complementary Sites in α_2-Antiplasmin and in Fibrinogen. Biochem. Biophys. Acta 579, 142 - 154 (1979).

182) Witt, J.; Hasler, K.: Klinische Bedeutung von Gerinnungsanalysen mit chromogenen Substraten. In: Prostaglandine und Plättchenfunktion; H.K. Bredin (Ed.), 227 - 243, F.K. Schattauer Stuttgart, New York (1978).

183) Wollmann, G.U.; Heller, H.; Hempel, V.; Schorer, R.: Konzentration und Aktivitätsmessungen wichtiger Serumproteinanteile in Serumkonserven. Infusionstherapie 11, 80 - 87 (1984).

184) Wuepper, K.D.: Prekallikrein Deficiency in Man. J. Exp. Med. 138, 1345 - 1355 (1973).

185) Wuepper, K.D.; Miller, D.R.; Lacombe, M.J.: Flaujeac Trait-Deficiency of Human Plasma Kininogen. J. Clin. Invest. 56, 1663 - 1672 (1975).

186) Yin, E.T.; Wesser, S.; Stoll, P.J.: Identity of Plasma-Activated Factor X Inhibitor with Antithrombin III and Heparin Cofactor. J. Biol. Chem. 246, 3712 - 3719 (1971).

H. TABELLEN-ANHANG

1. Prekallikrein (% d. Norm)

Seretin^{R}-Gruppe:

Probanden-Nr.	1	2	3
01	141,2	140,8	138,9
02	120,9	156,2	137,8
03	85,9	128,4	78,7
04	94,2	123,1	117,1
05	124,2	96,0	102,4
06	122,7	120,9	134,0
07	166,0	160,3	177,3
08	86,6	95,3	99,4
09	125,7	122,0	97,2
10	126,5	93,8	120,9
11	162,9	178,0	170,5
12	119,0	126,5	128,4
13	135,9	116,0	122,7
14	129,5	112,6	113,0

NaCl-Gruppe:

Probanden-Nr.	1	2	3
01	113,3	98,7	97,2
02	95,7	88,1	89,3
03	122,4	105,1	94,5
04	142,3	132,1	142,7
05	135,5	113,7	116,7
06	104,7	110,8	103,6
07	143,4	105,2	156,2
08	116,7	101,0	100,2

2. Kallikrein (U/l)

Seretin^{R}-Gruppe:

Probanden-Nr.	1	2	3
01	118,5	119,7	118,3
02	122,4	127,5	125,1
03	144,7	141,3	139,6
04	120,9	118,7	117,8
05	130,2	135,2	131,5
06	163,4	165,7	165,0
07	98,2	98,5	97,7
08	116,1	118,0	116,1
09	70,4	70,3	67,1
10	95,1	92,7	91,3
11	101,8	105,6	103,7
12	80,3	83,1	81,6
13	105,5	103,2	120,3
14	96,7	101,0	100,9

NaCl-Gruppe:

Probanden-Nr.	1	2	3
01	150,3	131,2	153,2
02	82,5	80,5	93,1
03	72,7	61,1	65,8
04	116,9	109,3	119,1
05	161,1	146,3	165,6
06	118,4	103,5	110,7
07	93,6	97,6	99,3
08	102,1	100,2	103,7

3. Plasminogen (% d. Norm)

Seretin^{R}-Gruppe:

Probanden-Nr.	1	2	3
01	100,2	83,5	81,2
02	97,5	116,8	128,8
03	91,5	82,9	97,9
04	100,9	121,8	123,2
05	144,8	133,5	121,5
06	138,8	129,2	135,8
07	115,5	103,5	123,5
08	133,5	115,5	125,2
09	125,2	124,2	116,2
10	148,5	150,1	122,2
11	122,8	125,5	115,2
12	111,9	124,8	121,8
13	109,2	115,8	120,2
14	136,2	119,5	136,2

NaCl-Gruppe:

Probanden-Nr.	1	2	3
01	126,2	100,2	97,9
02	146,5	134,8	135,2
03	91,2	88,2	87,5
04	100,2	92,5	112,8
05	104,2	94,9	90,2
06	111,5	136,5	111,9
07	98,9	87,9	86,2
08	126,5	105,9	104,5

4. Antiplasmin (% d. Norm)

Seretin^{R}-Gruppe:

Probanden-Nr.	1	2	3
01	127,3	106,9	113,8
02	119,4	105,9	147,7
03	110,3	143,3	132,3
04	109,1	135,1	128,2
05	108,4	105,6	1o),8
06	121,3	114,7	113,7
07	125,1	110,0	120,1
08	119,1	120,4	125,1
09	123,5	118,5	125,7
10	149,6	151,1	124,8
11	118,2	129,2	121,6
12	103,7	77,4	99,0
13	125,4	85,5	100,6
14	112,8	121,3	115,3

NaCl-Gruppe:

Probanden-Nr.	1	2	3
01	137,3	122,9	94,3
02	126,0	123,8	116,6
03	122,9	125,1	123,8
04	122,2	114,7	115,7
05	131,4	124,8	125,4
06	117,9	122,6	111,3
07	130,1	111,6	122,9
08	61,0	85,5	92,1

5. Antithrombin III (IU/ml - 25° C)

Seretin^{R}-Gruppe:

Probanden-Nr.	1	2	3
01	8,3	7,2	8,4
02	8,9	10,6	11,3
03	8,4	10,9	8,8
04	11,7	12,1	10,4
05	12,0	9,9	9,6
06	11,9	12,3	12,1
07	11,2	12,0	11,9
08	11,2	11,1	12,0
09	10,5	9,8	10,5
10	11,6	11,3	9,6
11	9,4	9,0	10,0
12	8,5	8,1	8,7
13	10,0	8,8	10,3
14	7,6	10,9	10,6

NaCl-Gruppe:

Probanden-Nr.	1	2	3
01	11,4	10,5	9,5
02	8,4	8,5	7,8
03	8,5	9,5	8,9
04	12,3	11,1	11,8
05	8,3	10,4	9,1
06	10,7	11,0	10,3
07	11,6	10,4	11,0
08	12,6	8,4	10,3

6. α_2-Makroglobulin (IU/ml - 25° C)

Seretin^R-Gruppe:

Probanden-Nr.	1	2	3
01	5,7	5,6	5,7
02	3,1	3,4	3,7
03	4,2	5,5	4,1
04	3,6	5,8	6,1
05	4,1	3,6	3,6
06	3,5	3,5	3,8
07	6,2	5,5	5,0
08	7,7	7,0	7,6
09	8,0	8,3	9,0
1o	8,0	8,1	6,7
11	6,7	6,7	6,6
12	4,7	4,4	4,7
13	4,5	3,6	4,2
14	4,6	4,6	4,5

NaCl-Gruppe:

Probanden-Nr.	1	2	3
01	7,1	6,9	6,4
02	4,2	3,9	4,2
03	4,9	4,9	3,5
04	6,7	6,6	6,2
05	4,6	5,4	5,9
06	6,1	8,2	7,6
07	5,6	5,4	5,8
08	6,6	7,2	6,8

7. α_1-Antitrypsin (IU/ml - 25° C)

Seretin^R-Gruppe:

Probanden-Nr.	1	2	3
01	1,5	1,9	1,6
02	1,2	1,2	1,2
03	1,2	1,6	1,4
04	1,3	1,3	1,8
05	1,3	1,0	1,1
06	1,4	1,2	1,3
07	1,2	1,2	1,2
08	1,7	1,4	1,5
09	1,3	1,0	1,4
10	1,9	1,9	1,9
11	0,9	0,8	0,9
12	1,2	1,2	1,3
13	1,1	0,8	1,1
14	1,2	1,2	1,1

NaCl-Gruppe:

Probanden-Nr.	1	2	3
01	1,7	1,4	1,2
02	1,7	1,5	1,7
03	1,4	1,2	1,4
04	1,7	1,2	1,5
05	1,5	1,3	1,4
06	1,4	1,6	1,6
07	1,1	1,0	1,0
08	1,3	1,1	1,2

LEBENSLAUF

	Waldemar Stürmer
Geburtsdatum:	5. August 1954
Geburtsort:	Ansbach/Mittelfranken
Eltern:	Friedemann Stürmer, Dipl.Landwirt und Dr. Anneliese Stürmer, Dipl. Landwirt, wohnhaft in 7093 Jagstzell-Orrot
Familienstand:	verheiratet seit 1982, zwei Kinder
Schulausbildung:	1961 bis 1965 Volksschule Jagstzell 1965 bis 1973 Peutinger-Gymnasium in Ellwangen/Jagst
Berufsausbildung:	seit 1974 zunächst Studium der Biologie mit Neigungsfächern Biochemie, Genetik, Molekularbiologie und Mikrobiologie an der Universität Hohenheim. Abschluß mit Diplom. Anschließend ab 1979 Studium der Medizin in Heidelberg und nach dem Physikum in Tübingen. Abschluß des Studiums am 6. November 1985.
Dienstzeit:	Während des Studiums (1981/82) Ableistung eines 18-monatigen Ersatzdienstes.